

Aus dem Med. Zentrum für Hygiene und Med. Mikrobiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Institut für Virologie  
Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

**Konstruktion einer rekombinanten Phage-Display-Antikörper  
Bibliothek zur Isolierung von humanen monoklonalen  
Antikörpern gegen Lassavirus und Plasmodium falciparum**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin  
(Dr. med.)

Dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
Martin Gabriel  
aus Cottbus

Marburg an der Lahn 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 19.03.2008; gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. J. ter Meulen

1. Correferent: Prof. Dr. H. Renz

2. Correferent: Prof. Dr. S. Bauer

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung .....	3
2.1	Lassavirus .....	3
2.1.1	Lassafieber: Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Therapie .....	3
2.1.2	Molekularbiologie des Lassavirus .....	5
2.1.3	.....	7
	Humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Lassavirus .....	7
2.1.4	Diagnostik .....	9
2.2	Malaria .....	9
2.2.1	Plasmodium-Falciparum-Malaria: Pathogenese, Klinik, Therapie .....	9
2.2.2	Biologie und molekularbiologische Pathogenese der Malariaerkrankung .....	10
2.2.3	Humorale und zelluläre Immunantwort gegen P. falciparum .....	12
2.3	Therapie von Infektionskrankheiten mit Immunseren und monoklonalen Antikörpern: Geschichte, Möglichkeiten und Ausblick .....	14
2.4	Struktur und Funktion von Antikörpern .....	17
2.5	Phage-display-Technik zur Generierung von humanen monoklonalen Antikörpern 20	
2.6	Fragestellung und methodischer Ansatz .....	22
3.	Material .....	24
3.1	Materialien für Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten .....	24
3.2	Materialien für die RNA Isolation .....	24
3.3	Materialien für die cDNA-Synthese .....	24
3.4	Materialien für die Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3 und dessen Verdau mit Restriktionsenzymen .....	25
3.5	Material für die Amplifikation der variablen Regionen der Antikörpergene mittels Polymerase Kettenreaktion und Verdau der entstandenen Produkte .....	25
3.6	Material für das Klonieren der Leicht- und Schwereketten gene in den Phagemidvector pHEN3 .....	29
3.7	Material für die Maxipräparation von Bibliothek-DNA der Leicht- und Schwereketten gene und deren Verdau mit Restriktionsenzymen .....	29
3.8	Material zur Vermehrung des Helferphagen .....	30

3.9	Materialien für den "Phagen-Rescue" .....	30
3.10	Materialien für das Screenen der Antikörperbibliothek auf positive Klone mittels Polymerase-Ketten-Reaktion und Restriktionsverdau .....	30
3.11	Material zur Bestimmung des Phagentiters.....	31
3.12	Material zur Immunotubeselektion der Antikörperbibliothek .....	32
3.13	Material für ELISA .....	32
3.14	Materialien für die Sequenzierung von DNA .....	33
3.15	Material zur Expression von monoklonalen Antikörperfragmenten .....	33
3.16	Materialien zur elektrophoretischen Proteinauftrennung (SDS-PAGE) .....	33
3.17	Material zur in-vitro Kultivierung von <i>P. falciparum</i> in humanen Erythrozyten....	35
3.18	Materialien für die Durchflusszytometrie, "FACS"-Analyse .....	35
3.19	Materialien für die Expression des Lassavirus-GP2 .....	36
3.20	Chemikalien .....	36
4	Methoden.....	38
4.1	Konstruktion der Phage-Display-Antikörperbibliothek .....	38
4.1.1	Patientenauswahl zur Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten .....	38
4.1.2	Gewinnung peripherer-Blut-Lymphozyten (PBL) .....	39
4.1.3	Isolation der RNA aus den PBL.....	39
4.1.4	Synthese der cDNA .....	39
4.1.5	Amplifikation der Gene für die variablen Bereiche der leichten Antikörperketten.....	40
	( V-kappa, V-lambda ) und der schweren Antikörperketten .....	40
4.1.6	Verdau der PCR-Produkte aus Punkt 4.1.5. mit Restriktionsenzymen und Reinigungsmethoden .....	41
4.1.7	Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3 und dessen Restriktionsverdau	41
4.1.8	Klonierung der Leichtketten-V-Gene in den Phagemidvektor pHEN3 .....	43
4.1.9	DNA-Präparation aus den Leichtketten-Bibliotheken in großem Maßstab ....	44
4.1.10	Klonierung der Schwereketten-V-Gene in die pHEN3-kappa und pHEN3-lambda-Bibliotheken .....	45
4.1.11	Herstellung des Helferphagen .....	45
4.1.12	Phagenrescue in großem Maßstab.....	46
4.1.13	Kolonie-PCR zum Screening auf Phagemide, die beide V-Regionen tragen ..	47
4.1.14	Bestimmung des Titers einer Phagenlösung .....	48

4.2	Antigene und deren Präparationen zur Immun-Selektion .....	48
4.2.1	Präparation von inaktiviertem Lassavirus für die Immunotube-Selektion.....	48
4.2.2	Präparation von rekombinantem Lassavirus-GP2 für die Immunotube-Selektion	48
4.2.3	Präparation von rekombinantem Plasmodium-Falciparum-Protein PfF2 für die Immunotube-Selektion .....	49
4.2.4	In-vitro-Kultivierung von P. falciparum in humanen Erythrozyten.....	49
4.3	Antikörpernachweise in den Seren des verwendeten Lymphozytenspenders.....	50
4.3.1	Nachweis von Antikörpern gegen das Plasmodium Falciparum Protein PfF2 in Patientenseren mittels ELISA und Westernblot-Analyse .....	50
4.3.2	Nachweis von Antikörpern gegen Oberflächenantigene auf Plasmodium-Falciparum-infizierten Erythrozyten in Patientenserum mittels indirekter Immunfluoreszenz .....	51
4.4	Immenselektion .....	52
4.4.1	Methode der Immunotube Selektion .....	52
4.4.2	Selektion von Antikörper-Phagen mittels Plasmodium falciparum infizierter Erythrozyten .....	53
4.5	Methoden zur Charakterisierung der Phagen-Display- Antikörper- Bibliothek und der selektionierten Phagen .....	54
4.5.1	Kolonie-PCR und BstnI-Restriktionsenzymverdau .....	54
4.5.2	Poly- und monoklonaler Phagen-ELISA.....	55
4.5.3	Durchflußzytometrische FACS-Analyse mit verschiedenen Erythrozyten-Präparationen.....	55
4.5.4	Lösliche Expression von monoklonalen Single-chain Antikörperfragmenten	56
4.5.5	DNA-Sequenzierung der in den Phagemidvektor klonierten scFv-Gene .....	56
4.5.6	Datenbank-Recherche und BlastP-Analyse der Proteinsequenzen .....	58
5	Ergebnisse .....	59
5.1	Konstruktion der rekombinanten Phage-Display-Antikörper Bibliothek .....	59
5.1.1	.....	59
	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese .....	59
5.1.2	PCR-Amplifikation der kappa V-Gene, der lambda V-Gene und der Schwerketten V-Gene .....	59
5.1.3	Ergebnisse der Verdau der PCR Amplifikate und deren Aufreinigungsmethoden .....	61

5.1.4	Ergebnisse der Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3 und dessen Restriktionsverdau und Aufreinigung .....	62
5.1.5	Ergebnisse der Klonierung der variablen Leicht- und Schwerketten-Gene der Antikörper in den Phagemidvektor pHEN3 .....	62
5.1.6	Ergebnisse der Klonierung der variablen Regionen der Schwerketten-Gene in die geschnittenen Vektoren pHEN3-kappa und pHEN3-lambda.....	65
5.1.7	Titerbestimmung der Phage-Display-Antikörper-Bibliothek.....	66
5.1.8	Sequenzierung einer Zufallsstichprobe von 14 Klonen der Bibliothek und Vergleich der Proteinsequenzen untereinander.....	66
5.1.9	Vergleich der Sequenzen aller Klone mit der Gen-Bank.....	67
5.2	Testung der unselektionierten Phage-Display-Antikörper-Bibliothek und verschiedener polyklonaler Seren mit den für die Selektion verwendeten Antigenen .....	68
5.3	Ergebnisse der Immunselektionen der Phage-Display-Antikörper-Bibliothek mit verschiedenen Antigenen .....	74
5.3.1	Selektion der Bibliothek mit NP 40 inaktiviertem Lassavirus .....	74
5.3.2	Selektion der Bibliothek mit Lassavirus-GP2.....	76
5.3.3	Selektion der Bibliothek mit Plasmodium-Falciparum-Protein PFF2 .....	78
5.3.4	Selektion der Bibliothek mit Plasmodium-falciparum (Bandia-Stamm) infizierten Erythrozyten.....	80
5.3.5	FACS-Analyse von monoklonal exprimierten, auf Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten selektierten Phagen .....	82
5.4	Expression löslicher monoklonaler Antikörperfragmente .....	83
6	Diskussion .....	85
6.1.	Erstellung der Phage-Display-Antikörperbibliothek.....	85
6.2.	Eigenschaften und Charakterisierung der erstellten Phage-Display-Antikörperbibliothek .....	86
6.3.	Screening und Selektion der erstellten Phage-Display-Antikörperbibliothek durch Antigenbindung.....	87
6.4.	Schlußfolgerung und Ausblick.....	90
7	Literaturverzeichnis.....	91
	Danksagung.....	97
	Curriculum Vitae.....	98
	Verzeichnis akademischer Lehrer .....	99
	Erklärung.....	100

## 1 Zusammenfassung

Ziel dieser technischen Arbeit war es die Phage-Display-Technik im Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. ter Meulen *de novo* zu etablieren, um humane monoklonale Antikörper gegen tropische Infektionserreger zu generieren. Als Modell-Antigene wurden rekombinante und native Antigene des Lassavirus und des Malaria-Erregers *P. falciparum* verwendet. Es wurden die Immunglobulin-G-Gene eines westafrikanischen Lymphozytenspenders mit nachgewiesenen Lassa- und Malaria-Antikörpern mittels PCR isoliert, amplifiziert und in einen Phagenvektor kloniert. Aus dieser Antikörper-Genbibliothek wurde eine Antikörper-Phagen-Bibliothek hergestellt wobei die rekombinanten Phagen jeweils die variablen Regionen der leichten und schweren Kette eines Antikörpers als so genannte single-chain-Antikörperfragmente in einigen Kopien auf ihrer Oberfläche tragen. Die Sequenzanalyse einer Stichprobe ergab für alle sequenzierten Klone, dass sie funktionelle Antikörper trugen und keine der identifizierten hypervariablen Regionen der Antikörpergene identisch waren. Die errechnete Diversität der Phagen-Bibliothek betrug ca. 5,25 Millionen Klone. Hierdurch wurden zwei wesentliche Merkmale der Antikörper-Phagen-Bibliothek, nämlich Funktionalität und Diversität sichergestellt. Die Inkubation der Bibliothek mit nativen und rekombinanten Lassa- Antigenen ergab keine spezifischen Antikörper gegen Lassavirus-Antigene. Die Inkubation der Bibliothek mit verschiedenen nativen und rekombinanten Malaria-Antigenen ergab jedoch eine Anreicherung von spezifischen Antikörper-Phagen und Nachweis von deren verstärkter Bindung an Plasmodien-infizierte Erythrozyten in der FACS-Analyse. Als Gründe für die geringe Ausbeute an spezifisch bindenden Phagen kommt in Betracht, dass der gesunde Spender zum Zeitpunkt der Blutentnahme möglicherweise nur sehr wenige spezifische periphere Plasmazellen besaß, da die akuten Infektionen sehr lange zurücklagen, sowie ungenügende Antigenität der für die Selektion verwendeten rekombinanten Proteine. Im Falle des Lassavirus, bei dessen natürlicher Infektion des Menschen nur niedrig-titrige Antikörper gebildet werden, spielt möglicherweise auch eine niedrige Affinität der Antikörper eine Rolle. Möglicherweise war die Diversität der generierten Bibliothek zu gering, in der Literatur beschriebene Bibliotheken erreichen Grössen bis  $10^9$  Klone. In Fortführung der begonnen Arbeiten konnte später gezeigt werden, dass unter Verwendung von nativen Virusantigenen (nicht inaktiviertes Gelbfieber-Impfvirus) und anderen, nach denselben Protokollen hergestellten Bibliotheken funktionelle Antikörper isoliert werden konnten (Daffis et al. 2005).

## Summary

The aim of this medical thesis research project was to establish phage-display technique in the research group of Dr. J. Ter Meulen in order to generate human monoclonal antibodies targeting tropical infectious pathogens. As model antigens recombinant and native antigens of *plasmodium falciparum* and the lassa virus were chosen. The IgG genes derived from a lymphocyte donor from Westafrica were isolated, amplified using PCR and were cloned into a phage vector. An antibody-phage library was generated from this antibody-gene library. The recombinant phages generated display the variable regions of the antibody light and heavy chains as so-called single-chain-antibody-fragments in several copies on their surface. Random sequence analysis revealed that all sequenced clones harbor antibodies and none of the sequence hypervariable regions were identical. The calculated diversity of the phage library was approximately 5,25 million clones, fulfilling the prerequisite of functionality and diversity. The incubation of the library with native and recombinant lassa virus antigen did not yield specific antibodies against lassa virus antigens. However, the incubation of the library with various native and recombinant malaria antigens revealed an accumulation of specific antibody-phages to *plasmodium* infected erythrocytes. Their binding to *plasmodium* infected erythrocytes could be shown by the FACS technique. Low specific antibody-phage yield could be due to low levels of specific plasma cells circulating after past infection in the healthy donor. Also, unsatisfactory antigenicity of the recombinant proteins used in the selection processes could be an explanation for the low efficiency. Concerning lassa virus infection it is known that during natural infection only low titres of antibodies are produced. This and also the low affinity of the antibodies could have affected the efficiency of the library. Compared to diversities of phage libraries published in the literature (with up to  $10^9$  clones) the diversity reached in this project could still be improved. Using the protocols of phage-display technique that was used in this project, Daffis et al. could show later that with native virus antigens (non-inactivated yellow fever vaccine) functional antibodies could be isolated from phage-display libraries.



## 2 Einleitung

### 2.1 *Lassavirus*

#### 2.1.1 **Lassafieber: Epidemiologie, Pathogenese, Klinik und Therapie**

Das Lassavirus, ein Arenavirus, ist Auslöser des Lassafiebers, einer Erkrankung, die in Ländern Westafrikas endemisch ist. Die Erkrankung wird von Nagern der Spezies *Mastomys* übertragen, welche den Hauptwirt für das Virus darstellen (Durchseuchung in Endemiegebieten 5-30%, Lecompte 2006) und dieses mit dem Urin ausscheiden. Die Krankheit wurde zuerst in einem Dorf in Nigeria beobachtet mit Namen Lassa, tritt aber auch in Sierra Leone, Liberia, Côte d'Ivoire und Guinea auf. Es werden in Westafrika jährlich bis zu 500.000 Infektionen durch das Virus vermutet, von denen aber nur ein Bruchteil von ungefähr zehn Prozent zu Hospitalisation führt, und etwa ein bis fünf Prozent der Infizierten an der Krankheit versterben. Die meisten der Erkrankungen laufen demnach unbemerkt oder unerkannt ab oder werden als sonstige Infektionskrankheit mit Fieber fehlgedeutet. Die Häufigkeit von Lassavirusantikörpern bei der Bevölkerung in Guinea z.B. beträgt 4-55% (ter Meulen et al., 1996) und in Sierra Leone konnten McCormick et al. eine Serokonversionsrate von 6 % und eine ebenso hohe Seroreversionsrate zeigen. Obwohl die Erkrankung das ganze Jahr über vorkommt gibt es eine saisonale Häufung in der Trockenzeit Februar bis Mai, was auf vermehrten Kontakt der Menschen mit den Nagern während der Ernte und Stabilität der Viruspartikel bei Trockenheit erklärt wird (Fichet-Calvet 2007). Ausbrüche ereignen sich aber auch aufgrund mangelnder hygienischer Verhältnisse in Krankenhäusern, bei Flüchtlingsströmen und unter UN-Soldaten (ter Meulen 2001).

Das Lassafieber bricht nach einer Inkubationszeit von etwa zehn Tagen aus. Die Krankheitssymptome reichen von eher unspezifischen Allgemeinsymptomen, wie Kopf und Gliederschmerzen bis hin zu abdominellen Beschwerden mit Diarrhoe und Erbrechen. Die Körpertemperatur steigt auf Werte um 39-41°C. Zu den typischen Symptomen gehören eine sehr schmerzhaft exsudative Pharyngitis, faziale Ödeme und retrosternale Schmerzen. In schweren Fällen, etwa 15%-20% der Hospitalisierten, kommt es zu Hämorrhagien, meist nur der Schleimhäute durch vaskuläre Permeabilität. Letale Krankheitsverläufe gehen terminal mit Lungenödem, Pleuraergüssen und hypovolämischem Schock einher (McCormick et al. 2001 und 1987). Eine interstitielle Pneumonie kann zu respiratorischer Insuffizienz führen. Bei einigen Patienten tritt eine Enzephalopathie durch Verwirrung, Tremor, Krampfanfälle und Koma klinisch in Erscheinung. Zum Tode führt die Erkrankung durch respiratorisches

Versagen und hypovolämischen Schock. Die Mortalität beträgt bei den hospitalisierten Patienten in Afrika ca. zehn Prozent und bei Kindern 12-27%. Nach Europa oder Nordamerika eingeführte Erkrankungsfälle hatten eine höhere Mortalität (Isaacson, M. 2001). Für Schwangere im dritten Trimenon beträgt das Letalitätsrisiko 30% und für das ungeborene Kind bis zu 85% (McCormick und Fisher-Hoch 2002). Von besonderem Interesse und für betroffene Kranke von schwerer sozialer Bedeutung ist das Auftreten einer Schallempfindungsschwerhörigkeit in bis zu 30% der stationär behandelten Fälle während der Rekonvaleszenz. Diese kann ein oder beidseitig auftreten und in bis zu 2/3 der Fälle permanent sein (Cummins et al. 1990). Es wird vermutet, daß diesem Hörverlust immunologische Prozesse zugrunde liegen. Aufgrund seiner Pathogenität, leichten Übertragbarkeit und der nur unsicheren Möglichkeit der Prophylaxe oder Therapie wird das Lassavirus in die höchste biologische Sicherheitsstufe (BSL 4) eingeordnet.

Die Pathogenese der Lassavirusinfektion, bzw. –Erkrankung ist noch nicht gut verstanden. Der Wirt *Mastomys* scheidet das Lassavirus mit dem Urin aus und Menschen infizieren sich durch den Konsum von mit Urin kontaminierten Lebensmittel, Einatmen von Virushaltigem Staub, Konsum der Nagetiere oder Untereinander. Einen wichtigen Übertragungsweg stellen nosokomiale Infektionen in Krankenhäusern bei nicht ausreichenden Hygienemaßnahmen dar.

Das Virus ist pantrop und infiziert initial dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Es ist wenig zytopathisch und bei Autopsiestudien von Lassapatienten fiel auf, dass es relativ wenig entzündungsbedingte Veränderungen gab, was auf eine Unterdrückung proinflammatorischer Zytokine, die *in vitro* gezeigt werden konnte, zurückgeführt wird. Es kommt bei schwerer Erkrankung, welche meist mit hoher Virämie einhergeht, zu einer Suppression der Thrombozyten-, Lymphozyten- und Neutrophilenfunktion, sowie zu Endotheldysfunktion. *In vitro* wird in Makrophagen die Bildung von IL-8 und TNF- $\alpha$  unterdrückt, beides Zytokine welche für die Induktion von Entzündungsreaktionen, wie z.B. Leukozytenadhäsion und Extravasation, verantwortlich sind. *In vivo* Studien konnten zeigen, dass fatale Lassavirusinfektionen mit einer geringen Zytokinantwort (IL-8 und TNF- $\alpha$ ) einhergehen, wohingegen bei nicht-tödlichem Ausgang hohe Zytikonspiegel gefunden werden. Es wird postuliert, dass es bei tödlicher Infektion zu einer Erschöpfung der Zytokinantwort kommt (Mahanty et al. 2001). *In vitro* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Infektion von dendritischen Zellen mit dem Lassavirus diese in ihrer Funktion der Antigenpräsentation behindert, so dass die Stimulation von T- und B-Zellen ausbleibt (Mahanty et al. 2003). Im Verlauf der Lassa-Erkrankung kommt es auch zu einer

Thrombozytendysfunktion, welche im Zusammenspiel mit der Endotheldysfunktion zu den beobachteten Hämorrhagien führt. Eine entstehende Lymphopenie wird möglicherweise durch Destruktion von B-Zellen hervorgerufen (McCormick und Fisher-Hoch, 2002). Durch direkte Schädigung durch das Virus und zytokinvermittelte Prozesse kommt es zu einer Endothelschädigung, welche zu „plasmaleakage“ und damit zu Hypovolämie, Ergüssen und Schock führen kann.

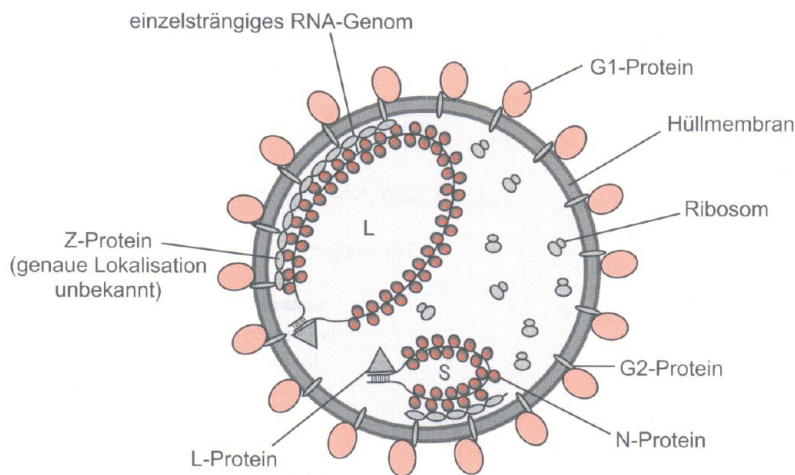
Als Therapie steht die Gabe von Ribavirin zur Verfügung. Ribavirin ist ein Guanosinanalogon und wird in der Zelle zu 5'-Monophosphat phosphoryliert, welches ein Enzym hemmt, das in der Guanosinmonophosphatsynthese involviert ist. Somit wird der Guanosinnukleotidbestand der Zelle verringert. Ribavirin hemmt auch das Enzym Guanyltransferase, welches die virale mRNA mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende versieht. Die Therapie mit Ribavirin, möglichst innerhalb von sechs Tagen nach Auftreten der ersten Symptome gegeben, kann die Letalität auf etwa ein Zehntel senken. In den frühen Jahren der Erfahrung mit dem Lassa-Fieber wurden Versuche unternommen die Erkrankung mit Rekonvaleszentenserum zu behandeln. Es gab 1969 den erfolgreich behandelten Erkrankungsfall eines Laborangestellten in Yaru, Nigeria, welcher mit Plasma einer Missionsschwester behandelt wurde und nach 24 Stunden eine dramatische Verbesserung seines Zustandes erlebte. Diese Erfolge ließen sich in klinischen Studien allerdings nicht wiederholen. Prinzipiell sollte Lassa-Immunplasma früh im Verlauf der Erkrankung gegeben werden und hohe neutralisierende Antikörpertiter enthalten. Die Herstellung eines neutralisierenden Antikörperserums könnte eine Option in der Therapie der Infektion darstellen. Wenn es gelingen würde diejenigen Antikörper zu identifizieren, welche für die Neutralisation verantwortlich sind und diese mit modernen gentechnischen Methoden in ausreichender Menge herzustellen, bestünde die Möglichkeit die Erkrankung spezifisch zu behandeln.

Bei der Behandlung der Patienten sollte zum Schutz vor nosokomialer Infektion strikt auf die Anwendung der besonderen Hygienemaßnahmen des „barrier-nursing“ geachtet werden. Im weiteren verläuft die Therapie supportiv.

### **2.1.2 Molekularbiologie des Lassavirus**

Das Lassavirus gehört zur Gruppe der Arenaviren, die ihren Namen von der im Elektronenmikroskop sichtbaren granulären Struktur im Inneren erhalten haben ( Lat. *arena* bedeutet Sand). Es gibt 20 verschiedene Arenaviren, 15 stammen aus der „Neuen Welt“ und 5 aus der „Alten Welt“. Sieben der Arenaviren sind humanpathogen. Es handelt sich um Viren mit segmentiertem einzelsträngigen RNA-Genom, die umhüllt sind. Es sind pleomorphe,

sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 50-300 nm. Die körnige, im Elektronenmikroskop sichtbare Struktur im Inneren rührt von Ribosomen her, welche die Viren beim Budding aus der Zelle mitnehmen. Das Virion enthält weiterhin ein zwei segmentiges Einzelstrang-RNA-Genom mit einer genetischen „ambisense“ Kodierung. Das kleinere Segment mit ca. 3.500 Nukleotiden enthält zwei Gene und kodiert für zwei Glykoproteine (GP1 und GP2), welche aus dem Vorläuferprotein GP-C prozessiert werden und ein Nukleoprotein (NP). Das größere Segment enthält zwei Gene und kodiert mit ca. 7.200 Nukleotiden für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase und das Z-Protein. Die Leserahmen für das GP-C und Z-Protein liegen in positiver Orientierung vor, während die Leserahmen für das NP und die Polymerase in negativer Orientierung vorliegen. Das Genom ist mit dem NP komplexiert.



**Abb. 2.1:** Aufbau des Lassavirus (aus Molekulare Virologie, S. Modrow)

An ihrer Oberfläche tragen die Lassaviren so genannte Spikes, welche aus jeweils einem Homotetramer der aus dem Vorläuferprotein GPC gespaltenen Proteine GP-1 und GP-2 bestehen. Die Proteine sind nicht kovalent miteinander verbunden, wobei das GP2 in der Membran verankert ist. Das Vorläuferprotein GPC wird im endoplasmatischen Retikulum von der zellulären Protease SKI-1/S1P gespalten (Lenz et al. 2001). Das Lassavirus bindet mit dem GP1 an seinen zellulären Rezeptor alpha-Dystroglykan. Unterschiedliche Affinitäten zu diesem Rezeptor scheinen mit unterschiedlicher Pathogenität des Virus zu korrelieren, wobei für LCMV gezeigt wurde, dass hoch affine Viren zu einer T-Zelldepletion in der Milz führen. Die Funktion des kleinsten Virusproteins Z ist noch ungeklärt, es werden regulatorische Funktionen angenommen. Das NP kommt Mengenmäßig am häufigsten vor und das größte Protein stellt die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase dar.

Nach dem Attachment des Virus an den zellulären Rezeptor alpha-Dystroglycyn wird es endozytiert, in das saure Endolysosom aufgenommen und die RNA, Nukleoproteine sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase in das Zytoplasma freigegeben. Nach Transkription, Replikation, Translation und Prozessierung der viralen Proteine werden die Bestandteile zur Zelloberfläche transportiert, wo sie assembliert und freigesetzt werden.

### **2.1.3 Humorale und zelluläre Immunantwort gegen das Lassavirus**

Antikörper gegen das Lassavirus treten schon sehr früh im Verlauf der Erkrankung auf, jedoch sind diese nicht neutralisierend, so dass trotz hochtitriger Antikörper während der akuten Erkrankung eine Virämie nachweisbar ist (McCormick 2001). Diese frühen Antikörper sind gegen das sich im Inneren des Virus befindliche NP gerichtet und können deshalb das Virus nicht neutralisieren. Neutralisierende IgG-Antikörper treten erst nach 4-6 Monaten bei ca. 60-70% der Erkrankten in der Rekonvaleszenz auf und meist in nicht sehr hohen Titern (ter Meulen 1999). Sie könnten aber eine Rolle beim Schutz vor Reinfektion spielen. Lassaspezifische IgG-Antikörper sind bis viele Jahre nach Infektion nachweisbar. Die Beseitigung des Virus aus dem Körper wird der zellulären Immunantwort zugeschrieben (ter Meulen 1999). Im Meerschweinchen-Modell konnte gezeigt werden, dass die Übertragung von Milz-Zellen aus immunisierten Tieren auf nichtimmunisierte Tiere einen auf CD8 + zytotoxischen Zellen beruhenden Schutz bot.

Es besteht während der Infektion eine Immunsuppression, wie in klinische Studien und *in vitro* gezeigt werden konnte. Es wird die Funktion von Makrophagen gehemmt, was sich in erniedrigten Spiegeln von IL-8 und TNF-alpha zeigen lässt (Lukashevich et al., 1999). Mahanty et al. konnten zeigen, dass nichtfatale Lassaerkrankungen mit hohen IL-8 und fatale Lassaerkrankungen mit niedrigen IL-8 Spiegeln einhergehen. Untersuchungen von hospitalisierten Lassapatienten zeigten bei mehr als der Hälfte der untersuchten Patienten schon bei Aufnahme nachweisbare (nicht neutralisierende) IgG- und IgM-Titer. Die Prognose der Erkrankung war jedoch nicht von der Höhe der Antikörpertiter, sondern vom Ausmaß der Virämie abhängig (Johnson et al. 1987). Da es keine beschriebenen Zweiterkrankungen an Lassa-Fieber gibt, sind die niedrigtitrigen neutralisierenden Antikörper und T-Zell-Immunität protektiv. Asymptomatische Titeranstiege als Hinweis auf Reinfektion wurden beschrieben.

Es existiert ein bei allen afrikanischen Arenaviren hindurch konserviertes T-Zell Epitop auf dem GP2, und es könnte, gerade, wenn man den erzeugten Schutz durch das Mopeiavirus (s.u.) betrachtet, die Hoffnung bestehen, dass eine universelle Vakzine hergestellt werden könnte (ter Meulen et al. 2004).

Die hier erwähnten Besonderheiten der Immunantwort auf die Lassavirusinfektion spiegeln auch die Schwierigkeit bei der Vakzine-Entwicklung wieder.

Seit den 1980er Jahren wird nach Möglichkeiten einen Lassavirusimpfstoff herzustellen geforscht. In Affenversuchen konnte das vermutlich apathogene Arenavirus „Mopeia“ die Tiere vor einer Lassavirusinfektion schützen (McCormick 2001). Inaktivierte Lassaviren hingegen konnten bei den geimpften Versuchstieren zwar Antikörpertiter erzeugen, jedoch starben alle Tiere beim Challenge. Rekombinante Vacciniaviren, welche Lassavirusproteine exprimieren wurden ebenfalls untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass, um einen ausreichenden Schutz im Affenmodell zu erzeugen die gleichzeitige Impfung mit dem GP-1 und dem GP-2 notwendig ist. Die Impfung mit dem NP oder einem der Glykoproteine alleine konnte trotz erzeugter Antikörpertiter auch hier nicht schützen (McCormick et.al. 2000). Auf der Basis eines Alphavirus-Replicons konnten Pushko et al. zeigen, dass sie Meerschweinchen gegen Lassaviruschallenge durch Immunisierung mit, GP oder NP exprimierenden „virus-like-particles“ schützen konnten. Sie konnten auch zeigen dass der Schutz nicht durch humorale Immunität vermittelt war. Meerschweinchen, denen Serum von immunen Artgenossen transfundiert wurde waren gegen Lassaviruschallenge nicht geschützt (Pushko et al. 2001). Diese Ergebnisse unterstreichen die Tatsache, dass der Schutz vor der Lassa-Erkrankung (Infektion oder Ausheilung) hauptsächlich dem zellulären Immunsystem zuzusprechen ist. Nichtsdestotrotz wurde die Existenz von neutralisierenden Antikörpern beschrieben, wobei deren Zielepitope und die damit verbundenen Funktionen nicht bekannt sind. Ein weiterer möglicher Ansatz zur Impfstoffentwicklung wäre es diejenigen Epitope, welche eine neutralisierende Immunantwort induzieren, zu finden und sie als Antigene in einem Impfstoff einzusetzen. Für Ebola konnte z.B. gezeigt werden, dass neutralisierende monoklonale Antikörper, welche mit Hilfe der Phage-Display-Methode erzeugt wurden, gegen das Glykoprotein gerichtet sind (Burton et al. 1999). Die Bindung der Antikörper an das GP könnte eine Blockade des Virus an seinen Zellulären Rezeptor darstellen und so die Ausbreitung verhindern.

Für LCMV ist bekannt, dass im Verlauf der Infektion neutralisierende Antikörper gegen das GP1 gebildet werden und dies wird auch für das Lassavirus vermutet. Desweiteren könnte es sein, dass neutralisierende Antikörper auch gegen das GP-2 gerichtet sind, um die Fusion im Endolysosom zu inhibieren.

In dieser medizinischen Doktorarbeit wurde u.a. rekombinantes GP2 als Antigen in den weiter unten beschriebenen Versuchen verwendet.

### 2.1.4 Diagnostik

In Endemiegebieten besitzt das gemeinsame Auftreten der typischen Symptome der Erkrankung wie Fieber, Pharyngitis, retrosternaler Schmerz und Proteinurie bei der klinischen Diagnose den höchsten Vorhersagewert. Die Labordiagnostik besteht aus Virusisolation, RT-PCR, ELISA und Immunfluoreszenz und steht weltweit nur in wenigen Speziallaboratorien zur Verfügung. Erschwerend kommt noch hinzu, dass das Versenden der hochinfektiösen Proben einen hohen Aufwand erfordert und die Labore der Sicherheitsstufe BSL 4 entsprechen müssen.

## 2.2 *Malaria*

### 2.2.1 *Plasmodium-Falciparum-Malaria: Pathogenese, Klinik, Therapie*

Der Hauptanteil der Erkrankungsfälle entfällt auf das subsaharische Afrika, etwa 20% der Erkrankungen kommen in Asien, Süd- und Mittelamerika vor. Es wird vermutet, dass jährlich etwa 200 bis 500 Millionen Neuerkrankungen auftreten, 1 bis 2,5 Millionen Menschen sterben unmittelbar als Krankheitsfolge an Malaria, wobei der Hauptanteil der Todesfälle im tropischen Afrika und dort bei Kindern zu verzeichnen ist. Es ist weitgehend nur die Malaria tropica, ausgelöst durch *Plasmodium falciparum*, welche für die Mortalität durch Malariaerkrankungen verantwortlich ist, während die Malaria tertiana durch *Plasmodium vivax* und ovale und die Malaria quartana durch *Plasmodium malariae* ausgelöst selten tödlich sind.

Das Hauptsymptom der Malariaerkrankung ist Fieber, daneben treten als Symptome noch Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Übelkeit und abdominelle Beschwerden mit Diarrhoe und Vomitus auf. In den Malariaanfällen, welche bei der *Malaria tropica* in unregelmäßigen Abständen auftreten haben die Patienten zunächst einen charakteristischen Schüttelfrost, gefolgt von einer Fieberphase mit heißer trockener Haut und einer Abklingphase mit starkem Schweißausbruch. Das Fieber wird durch das Platzen von mit Schizonten gefüllten Erythrozyten ausgelöst. Deshalb kommt es auch zu Anämie und in schweren Fällen zu massiver intravaskulärer Hämolyse mit Hämoglobinämie und -urie, woher die alte Bezeichnung Schwarzwasserfieber für die Krankheit herrührt. Zu den schweren Komplikationen, welche zum Tod an einer Malariainfektion führen können gehören schwere Anämie, Lungen- und Nierenversagen und cerebrale Beteiligung. Prognostisch ungünstige Zeichen sind Parasitämie über 5% bei nicht Immunen, Hypoglykämie, Laktatacidose, lange

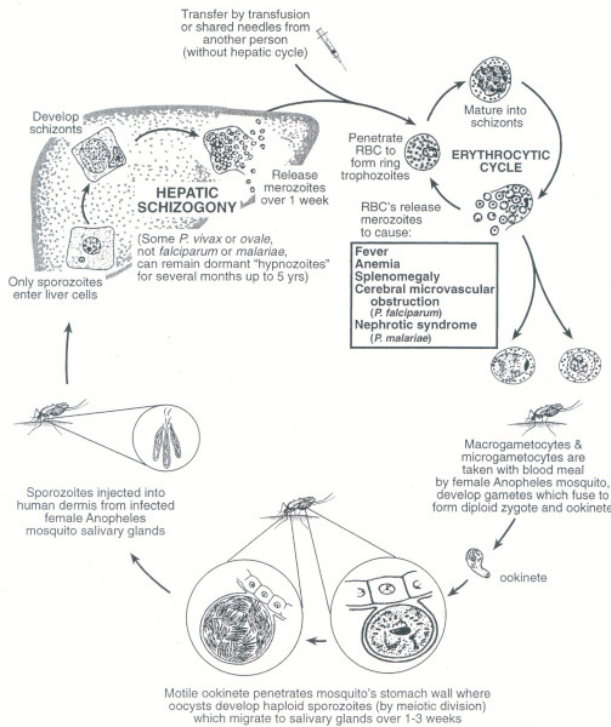
Fieberphasen, Multiorgandysfunktionen und Alterierung des neurologischen Status, insbesondere des Bewusstseins.

Unkomplizierte Fälle werden mit Chloroquin, Halofantrine und Primaquine behandelt. Komplizierte Malaria, d.h. mit cerebraler Involvierung wird mit Chinin behandelt, welches intravenös gegeben wird. Unkomplizierte Malaria mit Erbrechen wird entweder mit intramuskulärer oder intravenöse Medikamentengabe behandelt. Ein Medikament gegen alle Stadien des Plasmodiums zugleich gibt es nicht. Problematisch ist die seit einigen Jahren zunehmende Resistenz der Plasmodien auf viele Malaria-Medikamente zu sehen. Gegen das kostengünstige Chloroquin sind viele Plasmodien weltweit resistent. Es wird deshalb auf Mono- oder Kombinationstherapien mit den Artemisininen (Artemether, Artether und Artesunat) zurückgegriffen. Diese sind hocheffektive Antimalariamittel mit geringen Nebenwirkungen.

### **2.2.2 Biologie und molekularbiologische Pathogenese der Malariaerkrankung**

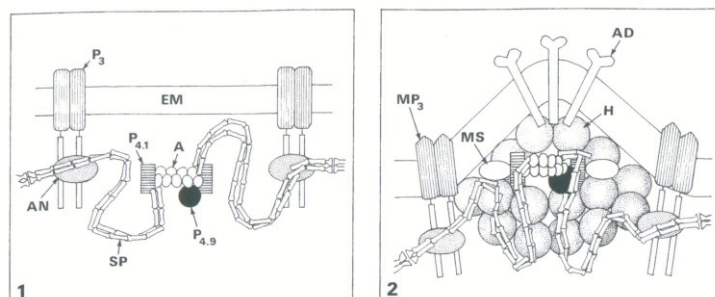
Der Mensch wird durch den Stich von Anopheles Mücken mit Sporozooiten infiziert welche sofort in Leberzellen eindringen, sich dort zu Merozoiten entwickeln und freigesetzt werden. Jeder dieser Merozoiten kann ein rotes Blutkörperchen infizieren, in welchen sich dann entweder ein Erythrozytenschizont oder ein Gametozyt entwickelt. Die Erythrozytenschizonten können wiederum platzen, Merozoiten freisetzen, die wieder Erythrozyten infizieren und somit den Krankheitsverlauf aufrecht erhalten. Die freigesetzten Gametozyten können von den Menschen stechenden Mücken wieder aufgenommen werden und sich dort innerhalb von zwei bis drei Wochen zu Sporozoiten entwickeln.





**Abb.2.3:** Malaria life cycle

Für die Krankheitserscheinungen verantwortlich sind nur die erythrozytären Formen der Plasmodien. Infizierte Erythrozyten können sich an andere Körperzellen heften (Zytoadherenz) oder an nicht infizierte Erythrozyten und so zu Rosettenbildung führen. Es bestehen große Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Erythrozyten. Infizierte Erythrozyten tragen auf ihrer Oberfläche so genannte Knobs, gebildet werden diese von Proteinen, genannt Rosettin und Rifin, und von Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein (PfEMP1) (Chen Q. et al., 2000 und Staalsoe T. et al., 1999).



**Abb.2.4:** Infizierter Erythrozyt mit Knobs und schematische Darstellung

Die Oberfläche der Erythrozyten wird durch Expression dieser Proteine unflexibler und kann sich auch u.a. an Kapillarendothel anlagern, ein Vorgang, der mit der Pathogenese der

cerebralen Malaria verbunden ist und außerdem die infizierten Erythrozyten vor Phagozytose in der Milz schützt. In vitro angezüchtete Parasiten von schweren cerebralen Malariafällen neigen stärker zu so genannter Rosettenbildung als Parasiten leichter Verlaufsformen (Qijun et al. 2000 Review). Für diese Rosettenbildung und die endotheliale Zytoadherenz ist unter anderem auch das PfEMP1 verantwortlich, welches durch variable var-Gene codiert wird und mehrere Domänen mit verschiedenen Funktionen besitzt. Weitere Auslöser der zerebralen Symptomatik sind Makrophagenprodukte wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffmetabolite. Endotheliale Rezeptoren für infizierte Erythrozyten sind u.a. CD36, CD31 und ICAM1 (Noviyanti et al. 2001). Neben der hypothetischen Möglichkeit die Pathogenese der Malariaerkrankung durch Inhibition der Interaktion der Parasiten mit diesen zellulären Rezeptoren zu beeinflussen, könnte auch die Invasion von Erythrozyten ein Therapieziel darstellen. Merozoiten, welche sich frei im Blutstrom befinden müssen sich zu ihrer weiteren Vermehrung wieder an Erythrozyten anheften und in diese eindringen. Dies geschieht mit Hilfe mehrerer Merozoiten-Oberflächenproteine, die sehr variabel sind, dem Erythrozyten-Membran-bindenden-Protein EBA 175 und dem Pf60 Protein. Das EBA-175 bindet an Sialinsäurereste des Glykophorin A des Erythrozyten bei der Invasion des Parasiten. Die Rezeptor-bindende Domäne des EBA-175 liegt aminoterminal in einer relativ konservierten, cysteinreichen Region, und wird PfF2 genannt. Eine Arbeitsgruppe in Neu-Delhi konnte dieses PfF2 rekombinant in E.coli herstellen und es nach Purifikation über Ni-NTA in seine natürliche Faltung renaturieren. Mit diesem nativ gefalteten Protein wurden Kaninchen immunisiert und mit deren Immunsereen konnte von dieser Gruppe gezeigt werden, dass in vitro eine Inhibition der Invasion von Erythrozyten durch Plasmodium falciparum Merozoiten möglich ist (Pandey et al. 2002). Immunisierung mit diesem Protein könnte deshalb einen Ansatz zur Vakzinierung von Menschen gegen Malaria darstellen.

### **2.2.3 Humorale und zelluläre Immunantwort gegen P. falciparum**

Die Immunantwort gegen P. falciparum ist durch die unterschiedlichen Stadien der Parasitenentwicklung in den Hepatozyten und Erythrozyten geprägt (Malaguarnera 2002, Review).

Proteine der Sporozoiten werden von den Hepatozyten prozessiert und als Peptide an MHC-Klasse-1 Molekülen präsentiert, wo sie eine zytotoxische Reaktion und damit Zerstörung der infizierten Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Diese

Zellen produzieren Interferon  $\gamma$  und induzieren über NO-Bildung die Zerstörung der Hepatozyten.

Merozoiten dringen in die Erythrozyten ein und bringen diese nach ihrer Vermehrung zum platzen, was Antigene (u.a. Glykolipide) des Parasiten in die Blutbahn freisetzt und die Bildung von u.a. Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  in Makrophagen induziert. Dies führt zum Fieber. Es werden Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktiviert, welche die Parasiten Antikörper-abhängig und unabhängig phagozytieren. In ihnen kann Hämozin (ein Abbauprodukt von Hämoglobin und Parasitenpigment) nachgewiesen werden, welches mit infektionsbedingter Immunsuppression und Einschränkung der Phagozytenaktivität, sowie der Fähigkeit der MHC-Klasse-2 Präsentation in Verbindung gebracht wird.

Die Entwicklung einer humoralen Immunität scheint für die Ausbildung einer Plasmodien-Subtyp-spezifischen Immunität ausschlaggebend zu sein. Bekannt ist, dass Kinder in Endemiegebieten wesentlich schwerer erkranken als Erwachsene, welche eine auf Antikörpern basierende Immunität entwickeln. Es scheinen hier Antikörper gegen das auf *P. falciparum* infizierten Erythrozyten exprimierte Protein PfEMP1 eine wichtige Rolle zu spielen. PfEMP1 ist für endotheliale Zytoadherenz verantwortlich und bewahrt so den infizierten Erythrozyten vor der Sequestration in der Milz. Die Inhibition dieser Funktion kann diesen wichtigen Pathogenitätsfaktor behindern. Der Antikörpertiter gegen Erythrozyten-Oberflächen-Antigene korrelierte mit dem Schutz vor Erkrankung, denn Kinder welche im Beobachtungszeitraum nicht erkrankten hatten höhere IgG-Titer als erkrankte (T.G. Theander et al. 2001). Obwohl die Immunität gegen das PfEMP1 Stamm-spezifisch zu sein scheint gibt es doch Epitope auf diesem Protein, welche eine Stamm-übergreifende Antikörperantwort hervorrufen. Baruch et al. konnten mit Hilfe generierter monoklonaler Antikörper Kreuzreaktivität in sogenannten Cystein-reichen Interdomain-Regionen (CIDR1) des PfEMP1 nachweisen. Als weitere Mechanismen der Abwehr der *P. falciparum* Infektion durch Antikörper werden die Inhibition der Invasion der Merozoiten in die Erythrozyten, die Antikörper-vermittelte Phagozytose und Komplementaktivierung postuliert (Pleass und Holder 2005). Die bei einer Malariaerkrankung entstehenden Antikörper, bis hin zur Hypergammaglobulinämie, können selbst an der Pathogenese beteiligt sein. Entstehende IgM, IgG und IgE werden mit der Rosettenbildung, plazentare Malaria und schwere Malariafälle durch den Parasiten begünstigende Interaktionen mit FC-Rezeptoren auf Thrombozyten, B-Zellen, Endothelzellen und Plazentagewebe in Verbindung gebracht. „Sinnvolle“ FC-Rezeptoren können durch Immunglobuline besetzt sein und in ihrer Effektorfunktion gestört werden.

Die Immunantwort, bzw. schützende Immunität gegen die Malariaerkrankung scheint also zu einem nicht unerheblichen Anteil von der humoralen Immunabwehr getragen zu werden, was die berechtigte Hoffnung auf die Möglichkeit einen Impfstoff zu entwickeln unterstreicht. Logische Voraussetzung dafür erscheint zu sein, diejenigen Antigene des Parasiten zu identifizieren, welche eine möglichst Stamm-übergreifende Kreuzreaktivität des Immunsystems bei einer Impfung hervorrufen können. Mit Hilfe der in dieser medizinischen Doktorarbeit weiter unten beschriebenen Methoden wurde ein solcher Ansatz versucht.

Die hohe Antigenvielfalt von *Plasmodium falciparum* erfordert bei der Impfstoff- oder der Immunserumherstellung die Verwendung eines breiten Antikörperspektrums. Sauerwein et al. konnten mit Hilfe der Phage-Display-Technik rekombinante humane Antikörper gegen das Pfs48/45 Protein von *Plasmodium falciparum* herstellen. Pfs48/45 ist ein potentiell Ziel für Transmissions-blockierende Immunität und wird auf der Oberfläche von Makrogameten exprimiert. Gerade die große Antikörpervielfalt einer Phage-display-Bibliothek könnte die Möglichkeit bieten ein breites Spektrum an auch aus geographisch unterschiedlichen Regionen stammenden rekombinanten Malariaantikörpern zu generieren.

### ***2.3 Therapie von Infektionskrankheiten mit Immunseren und monoklonalen Antikörpern: Geschichte, Möglichkeiten und Ausblick***

Schon Ende des 19. Jahrhunderts war die neutralisierende Wirkung von Seren immunisierter Tiere gegen verschiedene Krankheitserreger bekannt (Casadevall A., 1999). Man verwendete in der frühen ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts viele verschiedene Immunseren gegen Infektionskrankheiten, beispielhaft waren die Pionierarbeit und Therapieerfolge mit Diphtherieserum durch Emil von Behring aus Marburg (E. von Behring 1913). Diese Seren kamen damals meist vom Pferd, aber auch vom Kaninchen und der Ziege. Es wurden Krankheiten therapiert wie Pneumokokken Pneumonie, Diphtherie, Keuchhusten, Masern, Meningokokkenmeningitis und Scharlach. Die Therapien erwiesen sich oft als wirksam oder zumindest besser als gar keine Therapie und noch heute ist die Verabreichung von gepoolten Immunglobulinen bei z.B. Kindern mit Immundefekten oder Frühgeborenen anerkannte Behandlungsmöglichkeit. Mit der Einführung der Antibiotika wurden die meisten Immunserumtherapien gegen bakterielle Infektionen überflüssig. Bis heute geblieben sind die Antiserumtherapien gegen Diphtherietoxin, Tetanustoxin und Botulinumtoxin, wobei nur das Tetanusantitoxin vom Menschen ist, die beiden anderen vom Pferd. Mit Aufkommen von immer mehr antibiotikaresistenten Bakterien wird die antibakterielle Therapie mit

Antikörpern aber wahrscheinlich wieder einen Aufschwung erlangen. Gegen Virusinfektionen sind die chemotherapeutischen Möglichkeiten noch nicht auf so breitem Feld fortgeschritten, dass man in allen Fällen auf den Einsatz von Immunsereen verzichten könnte. Besonders in Infektionsnotfällen verlässt sich die Medizin auch heute noch eher auf Antiseren als auf z.B. aktive Immunisierung allein. Bei dem Biss durch ein tollwutverdächtiges Tier ist neben der aktiven Immunisierung die Gabe von humanem oder equinen Immunsereum unerlässlich. Auch nach Exposition mit Hepatitis-B-Virus (HBV) und nach der Geburt eines Kindes einer HBV-positiven Mutter wird versucht mit einer kombinierten aktiven und passiven Immuntherapie eine Infektion zu verhindern. HBV-Immunglobulin wird auch zur Prophylaxe der Reinfektion nach HBV-bedingter Lebertransplantation gegeben. Den Ausbruch der Masernerkrankung kann man nach Exposition mit Immunglobulin verhindern oder den Krankheitsverlauf abschwächen. Hyperimmunglobulin gegen Varicella-Zoster-Virus wird bei Expositionsverdacht immunsupprimierten Kindern, seronegativen Schwangeren, Neugeborenen perinatal, sehr Frühgeborenen und Transplantatempfängern gegeben. Seren gegen Mumps und Röteln haben ihre Wirksamkeit nicht beweisen können. Hepatitis A Immunglobulin wurde bis vor wenigen Jahren zur Prophylaxe der Erkrankung vor Reisen angewendet, ein aktiver Impfstoff ist heute erhältlich. Immunsereen gegen folgende weitere Viruserkrankungen existieren, werden aber aufgrund anderer Indikationen gegeben, wie z.B. Immunschwächekrankheiten oder Immunsuppressionen nach Organtransplantation: Zytomegalievirus und Epstein Barr Virus. Der einzige zur Zeit in der Klinik verwendete lizenzierte und kommerziell hergestellte Monoklonale Antikörper gegen Infektionskrankheiten ist Palivizumab, ein humanisierter Mausantikörper gegen das Respiratorische Synzytialvirus. Die prophylaktische Gabe des Antikörpers führt bei Kleinkindern mit chronischen Lungenkrankheiten und anderen Risikofaktoren während der RSV-Saison, sowie bei Frühgeborenen zu einer 50%-igen Senkung der Hospitalisationsrate. Immunglobuline wurden experimentell mit Erfolg gegen Pockenviren angewendet und es wurde zur Verminderung von Impfkomplicationen nach Vacciniaimpfung bei Risikopatienten, mit zum Beispiel Ekzem, angewendet. Bei viralen hämorrhagischen Fiebrern wie Ebola und Lassa-Fieber wurden auch Immunsereen therapeutisch eingesetzt allerdings mit unklaren Resultaten. Bezüglich der Immunsereumtherapie des Lassafiebers besteht Konsens in der Auffassung, dass die verabreichten Seren hochtitrig neutralisierend sein müssen und so früh wie möglich gegeben werden sollten. Somit stellt die Therapie von Infektionskrankheiten mit Immunsereen oder Antikörper-Präparationen immer noch eine legitime Therapieoption dar, besonders in Situationen, wo es sich um Krankheiten mit hoher Letalität handelt und es keine

andere Behandlungsmöglichkeit gibt. Mit Hilfe der weiter unten beschriebenen Phage-Display-Technik können in Zukunft in vitro monoklonale Antikörper gegen weitere Krankheitserreger generiert werden. So gelang es ter Meulen et al. mit Hilfe dieser Technik mehrere monoklonale Antikörper gegen das SARS Coronavirus zu generieren und die Neutralisierung des Virus in vitro und in vivo zu zeigen (ter Meulen et al.). Konsens besteht in der Auffassung, dass für die Prophylaxe und Therapie von Virusinfektionen mit monoklonalen Antikörpern möglichst mehrere Klone verwendet werden sollten, um die Entstehung von Escapemutanten zu verhindern und ggf. auch verschiedene Virusvarianten (Quasispezies) zu neutralisieren. Die Antikörper sollten in den Zielorganen ausreichende Konzentrationen erreichen. Die Wahrscheinlichkeit für einen Therapieerfolg mit monoklonalen Antikörpern ist bei der Prophylaxe und Therapie der akuten Infektion höher als bei chronisch etablierter Infektion, da man davon ausgeht, dass virale Escape-Mutanten durch die körpereigene Abwehr neutralisiert werden, wohingegen bei chronischer Infektion ein intrazellulärer oder extrazellulärer Pool an Virusvarianten besteht, aus dem ständig neue Escape-Mutanten nachgebildet werden. Bakker et al. fanden beispielsweise zwei nicht kompetitive monoklonale Antikörper mit Hilfe der Phage-Display-Methode, welche gegen zwei verschiedene Epitope von Rabies Viren gerichtet sind und alle natürlich vorkommenden Viren neutralisieren. Zur Prävention der chronischen Reinfektion mit Hepatitis B-Virus in Lebertransplantaten erscheint die kombinierte Gabe von Immunglobulinen und Lamivudin wirksam (Karasu et al. 2004). Jahrling et al. konnten einen ähnlichen Therapieeffekt für die gleichzeitige Gabe von Lassaimmunserum und Ribavirin beobachten. Monoklonale Antikörper und deren Mischungen konnten sich in der Therapie von HIV-infizierten Patienten leider noch nicht bewähren, es kam in klinischen Studien sehr schnell zu Escapemutantenbildung (Rusert P. et al. 2005).

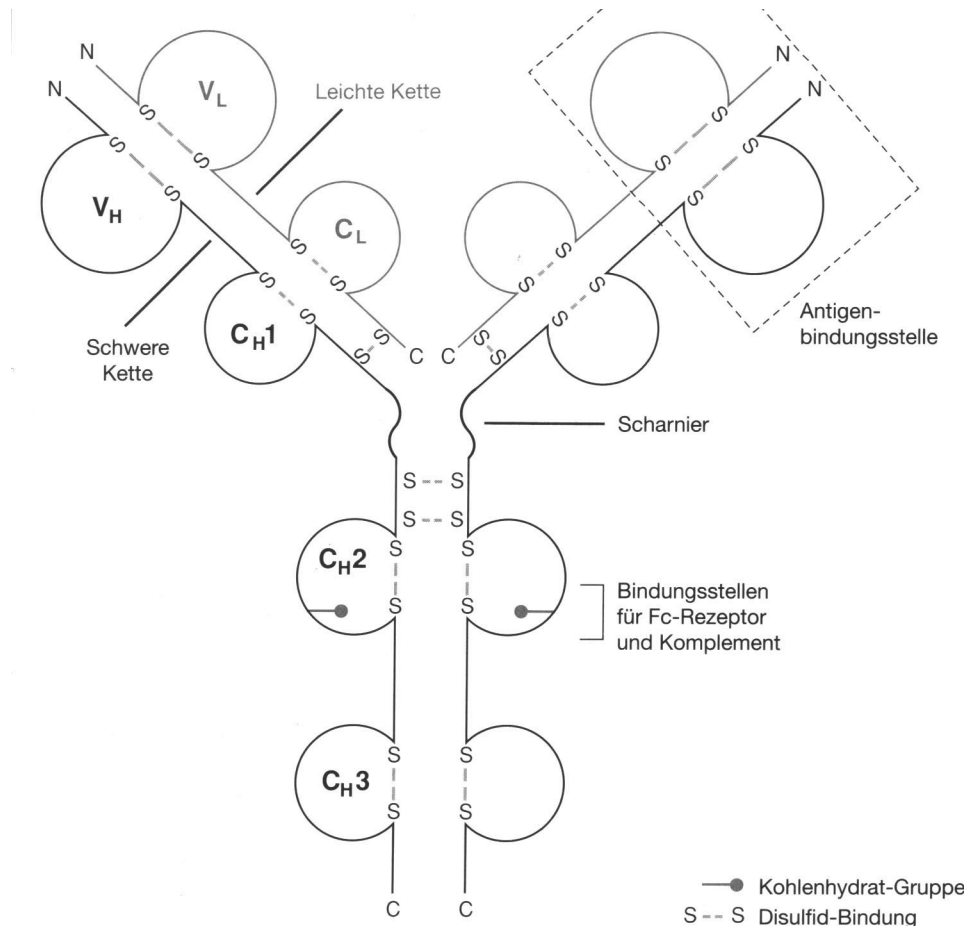
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Therapie von Viruskrankheiten, ob bekannte oder in Zukunft auftretende, mit (monoklonalen) Antikörpern ein weiterhin erfolgsversprechendes Konzept darstellt. Insbesondere durch die Phage-Display-Technik ist der Wissenschaft und Industrie ein Effizientes und schnelles Verfahren zur Generierung dieser Therapeutika an die Hand gegeben worden. Am Beispiel der Herstellung von wirksamen SARS-Antikörpern innerhalb eines Jahres (Marasco et al. 2004) zeigt sich die Stärke dieser Methode auch in Hinblick auf die Bekämpfung anderer pandemischer Gefahren durch z.B. Influenzaviren.

## 2.4 *Struktur und Funktion von Antikörpern*

Der Organismus reagiert auf „eindringende Keime“, also Antigene, mit seinem Immunsystem, welches in humoral, also lösliches und zelluläres Immunsystem aufgeteilt werden kann. Desweiteren kann man zwischen angeborener und adaptiver Immunität unterscheiden. Im weiteren soll hier nur auf die Immunglobuline als Teil des humoralen und adaptiven Immunsystems eingegangen werden.

Die Antikörper oder auch Immunglobuline als Teil des humoralen und adaptiven Immunsystems sind hoch spezialisierte Glykoproteinmoleküle, welche von den Plasmazellen gebildet werden. Plasmazellen entstehen aus B-Lymphozyten, nachdem diese im Falle eines Antigenkontaktes von T-Helfer-2-Zellen zur Differenzierung stimuliert wurden. Auch können bekannte Antigene, B-Lymphozyten direkt ohne T-Zell-Hilfe zur Sekretion von Antikörpern anregen. Die Antikörper sind Bestandteil der Gamma-Globulinfraktion des Blutplasmas und werden in Klassen aufgeteilt: Immunglobulin M, A, D, E und G, wobei die Klasse der Immunglobuline G noch in die Subklassen eins bis vier und die Klasse des IgA in zwei Typen aufgeteilt werden. Der Grundaufbau eines Antikörpers ist wie folgt: Es handelt sich um ein Y-förmiges Glykoproteinmolekül, welches aus zwei leichten und zwei schweren Ketten aufgebaut ist. Die schweren und leichten Ketten enthalten jeweils zwei Regionen V und C. Die C-Region ist hoch konserviert und wird nur isotypisch als kappa und lambda bei den leichten Ketten gebildet. Die C-Regionen der schweren Ketten dienen zum Binden an Zelloberflächenrezeptoren von Phagozyten und NK-Zellen oder zur Aktivierung von Komplement, sie werden den Ig-Subklassen entsprechend als gamma,  $\mu$ , alfa, delta and epsilon bezeichnet. Die zwei schweren Ketten untereinander und jeweils eine leichte und eine schwere Kette sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. An den zwei kurzen Armen des Moleküls befinden sich die Antigen bindenden Domänen. Die antigenbindenden Domänen werden aus den sich jeweils gegenüberliegenden N-terminalen variablen Regionen der schweren und leichten Ketten gebildet. Die kurzen Arme der Antikörpermoleküle können mit Papain abgespalten werden, es entstehen zwei monovalente Fab-Fragmente( Fragment-antigen-binding) und ein Fc-Fragment. Die antigenbindenden Domänen werden auch variable Regionen genannt, weil sie sich von Ig-Molekül zu Ig-Molekül stark unterscheiden. In der Bindungsstelle für das Antigen welche von zwei dieser variablen Regionen gebildet wird befinden sich wiederum hypervariable Regionen, welche durch ihre Konformation in der Bindungstasche in besonderem Kontakt zum Antigen stehen. Das Antigen wird in seiner dreidimensionalen Struktur erkannt, weshalb diese hypervariablen Regionen auch „complementary determining regions“ genannt werden. Die konstante Domäne des Moleküls

wird Fc- Teil ( Fraction crystalizable) genannt. Die Antikörper können je nach Subklassen als Monomere, meist IgG, als Dimere ( IgA) oder Pentamere ( IgM) vorkommen.

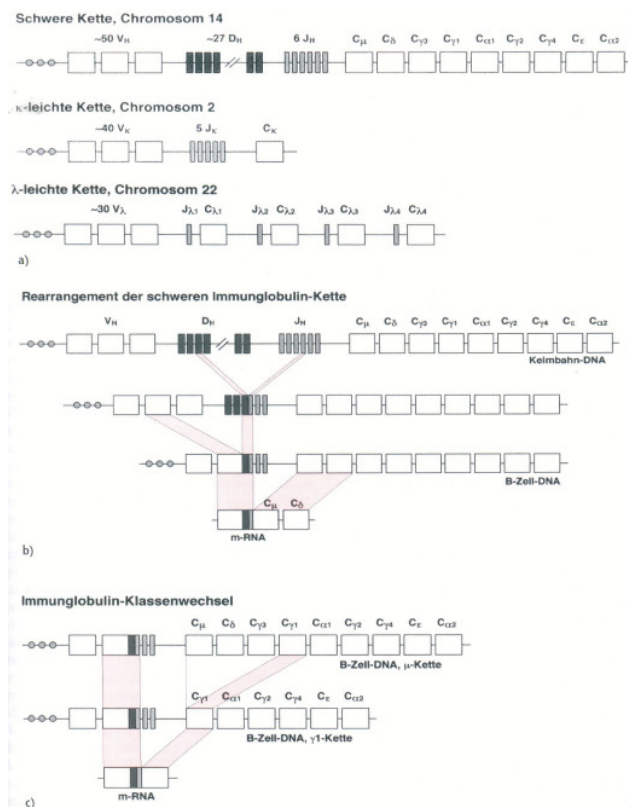


**Abb. 2.5:** Grundsätzlicher Aufbau eines Immunglobulinmoleküls

Auf die grosse Vielfalt von Antigenen muss das Immunsystem mit einer ebenso großen Vielfalt von Antikörpern reagieren können. Die Gesamtzahl, der Antigene auf die das menschliche Immunsystem reagieren kann wird auf mindestens  $10^9$  geschätzt und wird Lymphozyten Repertoire genannt. Das Immunsystem ist mit seinem großen Repertoire sogar in der Lage auf künstliche Antigene zu reagieren, mit denen der Mensch in seiner Evolution nie in Kontakt kam. Die große Vielfalt der Antikörper kommt durch somatische Rekombination der Gene für die variablen antigenbindenden Regionen der Antikörper zustande: Es gibt ein Arrangement von bestimmten Genen welche für die Antikörperabschnitte kodieren während die B-Zelle reift. Für die leichten Ketten kappa und lambda existieren jeweils Gencluster mit ca. 300 V-Leichtketten Genen, fünf J-Gene und ein



C-Gen. Jeweils ein Gen V, J und C wird zu einem Antikörperketten-Gen arrangiert und dann zu MessengerRNA transkribiert. Für die schweren Ketten funktioniert dies ähnlich, nur dass eine Auswahl aus ca. 1000 V-Schwerkettengenen, mehr als 10 D-Genen, vier J-Gene und neun C-Genen besteht. Somit kann bei rein zufälliger Arrangierung der Gene eine Diversität von 50000 Kombinationen für die VDJ-Schwerkette und 1000 Kombinationen für die VJ-Leichtkette erreicht werden. Wenn die schweren und leichten Ketten dann noch rein zufällig assembliert werden, kommt man auf ein potientes Gesamtrepertoire von ca.  $10^9$ - $10^{11}$  Möglichkeiten. Desweiteren können spezifische Enzyme durch Punktmutation im Antikörpergen die Affinität desselben erhöhen oder Leserasterverschiebungen ergeben neue Proteinsequenzen.



**Abb. 2.6:** Generierung der Antikörpervielfalt auf der Genebene

Die Immunantwort der B-Lymphozyten läuft dann folgendermaßen ab. Auf ihrer Oberfläche gebundenes IgM oder IgD bindet das Antigen und die B-Zellen wandern in die sekundären Lymphorgane ein, wo sie in den Follikeln in einer Keimzentrumsreaktion den Proliferationsreiz von T-Zellen erhalten. Dieser zweite Proliferationsreiz erfolgt über das Oberflächenmolekül CD40 des B-Lymphozyten, welcher mit CD154 auf der T-Zelle

interagiert, und durch Interleukin 4 aus der aktivierten T-Zelle (Lit.Brandis). Die B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen und sezernieren Antikörper, zunächst der IgM-Klasse, später IgG („class switch“). Wiederholter Kontakt mit dem und somatische Mutation führt zu einer Selektion von B-Zell-Klonen, die Antikörper mit zunehmend höherer Affinität sezernieren. Beeinflusst durch Signale (z.B. Chemokine) in den Keimzentren lymphatischer Organe, können B-Zellen ihre sezernierte Antikörper-Klasse zu IgA oder IgE wechseln. Der beschriebene Vorgang ist also T-Zellabhängig, die B-Zellaktivierung kann aber auch T-Zell-unabhängig ablaufen. Besonders repetitive Strukturen, wie z.B. Kapselpolysaccharide von Bakterien sind in der Lage die B-Zellen zu stimulieren, indem sie mehrere IgM-Moleküle auf deren Oberfläche vernetzen und so die Produktionskaskade in Gang setzen. Da die T-Zellsignale fehlen gibt es aber keinen Klassenwechsel und keine somatische Mutation, so dass nur IgM mit niedrigerer Affinität gebildet wird.

Wie oben schon mehrfach angedeutet ist die Effektorfunktion von Antikörpern vielfältig. Antikörper besonders der IgG1- und 3-Subklasse und IgA auf Schleimhautoberflächen neutralisieren bakterielle Exotoxine, vermindern durch ihre Bindung die Infektiosität von Viren oder die Adhärenz von Bakterien und Parasiten. Es werden auch von den Erregern gebildete Enzyme neutralisiert, welche diese zur Ausbreitung im Gewebe benötigen. Der Fc-Teil kann das Komplementsystem aktivieren und somit zur Lyse des Eindringlings beitragen, oder opsonisierend wirken und so mit Fc-Rezeptoren ausgestatteten Phagozyten die Aufnahme ermöglichen. Dies wird auch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität genannt, die Abwehr durch NK-Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten wird hierdurch antigenspezifisch. Ein ähnlicher Mechanismus läuft bei der Entzündungsentstehung durch IgE-vermittelte Degranulation von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten ab, wo auf den Zellen gebundenes IgE nach Antigenbindung Effektorfunktion auslöst.

## ***2.5 Phage-display-Technik zur Generierung von humanen monoklonalen Antikörpern***

Wie schon oben erwähnt kann die Herstellung von monoklonalen Antikörpern in vitro und in großem Maßstab eine Möglichkeit darstellen neue Therapeutika für Infektionskrankheiten zu entwickeln. Die ersten monoklonalen Antikörper wurden mit der so genannten Hybridomtechnik hergestellt. Es ist bekannt, dass Myelomzellen (Zellen eines B-Zelltumors) monoklonal Antikörper sezernieren. Dies hat man imitiert indem man B-Lymphozyten mit Myelomzellen somatisch hybridisierte und sie so immortalisierte um in unbeschränktem

Ausmaß Antikörper der gesuchten Sorte nach Selektion zu produzieren. Diese Methode war zwar fortschrittbringend ist aber sehr arbeits- und zeitaufwendig, und gelang nur mit Maus-, nicht jedoch mit menschlichen Zellen.

Eine neue, sehr elegante Möglichkeit zur Isolierung und Herstellung von monoklonalen Antikörpern stellt die Phagedisplaytechnik dar. Phagen sind Viren, welche nur Bakterien infizieren können und diese auch nur artspezifisch. Sie vermehren sich in den Bakterien teils lytisch, teils nicht lytisch. Die Phagedisplaytechnik stellt die entscheidende Verbindung zwischen dem Genotyp des Antikörpers und seinem selektierbaren Phänotyp, dar. Durch Klonierung der Nukleotidsequenzen der VH- und VL-Ketten, welche durch reverse Transkription aus B-Lymphozyten mRNA gewonnen wurden, in einen Phagemidvektor vor das Gen für das gp3-Protein des Phagen, exprimiert dieser ein VH-VL-gp3 dieses weitere Protein am N-Terminus des gp3 an seiner Oberfläche, wo es dann als sog. single-chain-fragment-variable(scFv) zur Bindung an Antigenen zur Verfügung steht(Chiswell et al.). Die Gene der variablen Regionen der gesuchten Antikörper werden durch PCR-Amplifikation aus einem Messenger-RNA-Pool vermehrt. Diese messenger-RNA stammt aus B-Lymphozyten und wird mit einem Set von 41 PCR-Primern nach Umschreiben in cDNA vermehrt, um sie dann in den Phagemidvektor zu klonieren. Die PCR-Primer sind gegen konservierte Abschnitte im sogenannten Framework der variablen Ketten gerichtet, deren Sequenz-Familien in Gendatenbanken niedergelegt sind. Dieser Phagemidvektor enthält nur das Gen für das gp3 und dann das scFv, sowie bakterielle und virale Replikations-origins. Phagemidvektor und Helferphage, der zur Komplettierung des Phagen-genomes notwendig ist, werden in E. coli-Bakterien kloniert und es entstehen die fertigen antikörperpräsentierenden Phagen. Das Ergebnis ist eine Bibliothek mit bis zu  $10^8$ - $10^9$  verschiedenen Phagenklonen, welche im Idealfall das gesamte Antikörperrepertoire des B-Lymphozytenpools, z.B. eines humanen Spenders enthält. Der Vorteil von immunisierten Bibliotheken besteht darin, bei richtigem Zeitpunkt der Lymphozytengewinnung, natürlich gereifte Antikörper gegen das gesuchte Antigen zu finden. Diese Phagenbibliothek kann in beliebiger Menge vermehrt werden und in ELISA-ähnlichen Verfahren auf ihre Antigenbindung überprüft werden, da sich die Phagen nun wie Antikörper verhalten. Die Selektionsmethode ist extrem sensitiv, da prinzipiell ein einziger gebundener Phage eluiert und in beliebiger Menge amplifiziert werden kann. Sie können im ELISA z.B., nach Bindung an ein Antigen mit einem anti-Phagen-Zweitantikörper detektiert werden. Es ist des Weiteren auch möglich die Phagen direkt zur Herstellung der Single-chain-fragment-variable (scFv) zu verwenden. Das entstehende Peptid besteht dann nur aus den zwei sich im Antikörpermolekül gegenüberliegenden variablen

Regionen der leichten und schweren Kette, verbunden durch ein artifizielles, flexibles Polypeptid („spacer“) bestehend aus Serinen und Glycinen. Dazu wird dann ein Bakterienstamm verwendet, der bei Induktion mit IPTG nur das Protein exprimiert. Die so hergestellten Antikörperfragmente können dann erneut auf ihre Bindung an Antigene überprüft werden, oder nach Fusionieren mit entsprechenden Fc-Teilen als vollständige Ig-Moleküle eukaryot exprimiert oder nach biochemischer Kopplung an Chemotherapeutika auch in der Tumorthherapie angewendet werden. Zur Generierung der Phagenbibliothek können neben B-Lymphozyten eines gegen das Antigen immunisierten Spenders auch B-Zellen eines in Bezug auf das Antigen naiven Spenders verwendet werden, man erhält dann eine sogenannte „naive Bibliothek“. Um in dieser naiven Bibliothek den gesuchten Binder zu finden muss sie größer sein, d.h. meist  $10^9$  Klone umfassen, und es werden nicht so hoch affine Antikörper wie nach somatischer Mutation gefunden (Lafaye et al.). Mit der Phagedisplaytechnik ist es sogar möglich Antikörper zu generieren die in natürlichen B-Zellen nie vorkommen. Man kloniert dazu randomisierte Gensequenzen für beliebige Peptide in den Phagemidvektor oder führt Mutationen in die CDR-Gene ein. Somit kann ein riesiges Repertoire an künstlichen Antikörpern hergestellt werden, welche auch Antigene binden können, mit welchen der „Genbank-Spender“ nie in Berührung kam, z.B. SARS-Coronavirus (van den Brink et al. 2005). Durch die beliebige Paarung der variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperketten im Scfv entstehen auch in den natürlichen Phagen-Bibliotheken von Immunisierten Spendern unnatürliche Antikörper. Die Paarungen sind rein zufällig, so dass ein großes Repertoire an Bindungsmöglichkeiten entsteht. Allerdings könnte die Verwendung dieser „unnatürlichen“ Antikörper aufgrund ihrer eigenen Immunogenität zu Problemen führen.

Die Phage-Display-Methode stellt somit eine vielversprechende Methode bei der Suche nach spezifisch bindenden Molekülen, welche sich ähnlich der Immunglobuline verwenden lassen, dar. Die schnelle Herstellung von neutralisierenden Antikörpern gegen diverse Antigene z.B. bei einer Epidemie verursacht durch ein neues Viren, wird durch diese Methode ermöglicht. Ein weiterer Vorteil dieser so generierten monoklonalen Antikörper besteht darin, dass sie als vollständig humane Moleküle selbst keine Immunantwort hervorrufen.

## **2.6 Fragestellung und methodischer Ansatz**

Ziel dieser technischen Arbeit war es die Phage-display-Technik im Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. ter Meulen de novo zu etablieren um monoklonale Antikörper gegen Lassavirus-Antigene und Malaria-Antigene mit Hilfe der beschriebenen Phage-display-

Technik zu erzeugen. Hierzu wurden Blutlymphozyten eines Lassa- und Malaria-seropositiven Spenders aus Guinea, West-Africa, zur Generierung einer Antikörper-präsentierenden Phagen-Bibliothek verwendet, um aus dieser dann mit Hilfe von Selektionsverfahren die antigenbindenden Phagen zu extrahieren. Mit diesen extrahierten Phagen könnten dann in unbeschränkter Menge monoklonale Antikörper (zunächst scfv) exprimiert werden um mit diesen weitere Versuche zu unternehmen. Die monoklonalen Antikörper könnten auf ihre Neutralisationsfähigkeit geprüft werden und dann als Therapeutikum angewendet werden. Sie könnten auch helfen durch Antigen-mapping-Versuche herauszufinden, welche Teile der Lassaviren und Malaria-Plasmodien für das Hervorrufen einer neutralisierenden Antikörperbildung verantwortlich sind.

### 3. Material

#### 3.1 *Materialien für Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten*

(durchgeführt von PD Dr. J. ter Meulen)

Kanülen und Monovetten zur Blutentnahme

50ml Falcon-Tubes mit jeweils 12,5ml Ficoll

PBS zum Waschen

Trypanblau zur Färbung

Neubauer Zählkammer

#### 3.2 *Materialien für die RNA Isolation*

PBS++(Phosphate buffered saline):	NaCl	8,0g
	KCl	0,2g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15g
	MgCl <sub>2</sub>	0,2g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
	CaCl <sub>2</sub>	0,13g
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

Fast RNA-Tubes-Green von Bio 101 inc.

Fastprep FP 120 Shredder

Ethanol

Rneasy-mini-column

RLT-buffer

RLT-buffer + β-Mercaptoethanol

RPE-buffer

#### 3.3 *Materialien für die cDNA-Synthese*

RNA

oligo(dt)15 primer

10mM dNTP mix

RNasin

0,1 M DTT

MMLV reverse Transkriptase von Stratagene (50 U/μl )

### ***3.4 Materialien für die Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3 und dessen Verdau mit Restriktionsenzymen***

LB-Medium (10g Pepton, 5g Hefeextrakt und 10g Kochsalz in einem Liter destillierten Wasser auflösen und autoklavieren )

Ampicillin Gebrauchslösung 100μg/μl steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt

Glucose

z-Kompetente E.coli Bakterien DH5alpha

Qiagen Maxiprep Kit

Restriktionsenzyme: Apa L1 und NotI von MBI

10xbuffer 4 (Biolabs; zu den Restriktionsenzymen )

BSA

Shrimp alkaline phosphatase von MBI

### ***3.5 Material für die Amplifikation der variablen Regionen der Antikörpergene mittels Polymerase Kettenreaktion und Verdau der entstandenen Produkte***

cDNA

aus dem Taq-core-kit von Qiagen: Q-Lösung

10x PCR-buffers

20x dNTPs

Oligonukleotidprimer:

- PCR-Amplifikation der kappa V-Gene: Reaktionen 1a-6a und 1b-6b ( nested PCR)

-back-primer:

Reaktionen 1a-6a

1a	huVk1Back-Apa	5`	GCC GGT AGT GCA CAG ATC CAG WIG ACC CAG TCT CC
2a	huVk2Back-Apa	5`	GCC GGT AGT GCA CAG GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC
3a	huVk3Back-Apa	5`	GCC GGT AGT GCA CAG ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC
4a	huVk4Back-Apa	5`	GCC GGT AGT GCA CAG ATT GTG ATG ACC CAC ACT CC
5a	huVk5Back-Apa	5`	GCC GGT AGT GCA CAG ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC

6a huVk6Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC

-for-primer

Reaktionen 1a-6a

CkFor 5` GAA GAC AGA TGG TGC AGC CAC AGT

-back-primer (nested-PCR):

Reaktionen 1b-6b

1b huVk1Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG ATC CAG WIG ACC CAG TCT CC

2b huVk2Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC

3b huVk3Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG ATT GTG WTG ACR CAG TCT CC

4b huVk4Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG ATT GTG ATG ACC CAC ACT CC

5b huVk5Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC

6b huVk6Back-Apa 5` GCC GGT AGT GCA CAG ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC

-for-primer

Reaktionen 1b-6b

huJk1For-Not 5` GCC TTC TGC GGC CGC ACG TTT GAT YTC CAS CTT GGT CCC

+huJk2For-Not 5` GCC TTC TGC GGC CGC ACG TTT GAT ATG CAC TTT GGT CCC

+huJk3For-Not 5` GCC TTC TGC GGC CGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC

- PCR-Amplifikation der lambda V-Gene: Reaktionen 7a-17a und 7b-17b ( nested PCR)

-back-primer:

Reaktionen 7a-17a

7a huVλ1ABack-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC

8a huVλ1BBack-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC

9a huVλ1CBack-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC

10a huVλ2Back-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAR TCT GCC CTG ACT CAG CCT

11a huVλ3ABack-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CTT TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC

12a huVλ3BBack-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CTT TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC

13a huVλ4Back-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC

14a huVλ5Back-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC

15a huVλ6Back-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CTT AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA

16a huVλ7/8Back-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC

17a huVλ9Back-Apa 5` GGC GGT AGT GCA CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC



-for-primer

Reaktionen 7a-17a

huCλFor1	5`	TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC TG
+huCλFor2	5`	AGA GCA TTC TGC AGG GGC CAC TG

-back-primer (nested-PCR):

Reaktionen 7b-17b

7b	huVλ1ABack-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAG TCT GTG CTG ACT CAG CCA CC
8b	huVλ1BBack-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAG TCT GTG YTG ACG CAG CCG CC
9b	huVλ1CBack-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAG TCT GTC GTG ACG CAG CCG CC
10b	huVλ2Back-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAR TCT GCC CTG ACT CAG CCT
11b	huVλ3ABack-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CTT TCC TAT GWG CTG ACT CAG CCA CC
12b	huVλ3BBack-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CTT TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC
13b	huVλ4Back-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAC GTT ATA CTG ACT CAA CCG CC
14b	huVλ5Back-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAG GCT GTG CTG ACT CAG CCG TC
15b	huVλ6Back-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CTT AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA
16b	huVλ7/8Back-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CAG RCT GTG GTG ACY CAG GAG CC
17b	huVλ9Back-Apa	5`	GGC GGT AGT GCA CWG CCT GTG CTG ACT CAG CCM CC

-for-primer

Reaktionen 7b-17b

huVλ1For-Not	5`	GAG TCA TTC TGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT GAC CTT GGT CCC
+ huVλ2For-Not	5`	GAG TCA TTC TGC GGC CGC ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC
+ huVλ3For-Not	5`	GAG TCA TTC TGC GGC CGC ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC

- PCR-Amplifikation der Schwerketten V-Gene: Reaktionen 18a-25a und 18b-25b (nested PCR)

-back-primer:

Reaktionen 18a-25a

18a	huVH1/7Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG
19a	huVH2Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG

20a	huVH3ABack-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
21a	huVH3BBack-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG
22a	huVH4ABack-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG
23a	huVH4Bback-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG
24a	huVH5Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GC
25a	huVH6Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG

-for-primer

Reaktionen 18a-25a

huIgGFor1                      5`      GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA

+ huIgGFor2                    5`      GAC GGA TGG GCC CTT GGT GGA

-back-primer (nested-PCR):

Reaktionen 18b-25b

18b	huVH1/7Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTG CAG CTG GTG CAR TCT GG
19b	huVH2Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG RTC ACC TTG AAG GAG TCT GG
20b	huVH3ABack-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG
21b	huVH3BBack-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG WCY GG
22b	huVH4ABack-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GG
23b	huVH4Bback-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG STG CAG CTG CAG GAG TCS GG
24b	huVH5Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAR GTG CAG CTG GTG CAG TCT GC
25b	huVH6Back-Sfi	5`	CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG

-for-primer

Reaktionen 18b-25b

huJH1-2,4-5For-Xho 5`      ACT GGT CCG ACT CGA GAC GGT GAC CAG GGT KCC

+huJH3,6For-Xho      5`      ACT GGT CCG ACT CGA GAC GGT GAC CRT KGT CCC

Qiagen -spin columns

Restriktionsenzyme : Apa L1 mit buffer 4 und NotI mit buffer 3

BSA

Roger-Rapid DNA-precipitation-kit

Qiagen Gel-extraction kit

### ***3.6 Material für das Klonieren der Leicht- und Schwerekettengene in den Phagemidvector pHEN3***

10xbuffer

Ligase

pHEN3 ApaL1-NotI-SAP

NotI und ApaL1 verdaute PCR-Amplifikate

pHENkappa und pHENlambda SfiI-XhoI-SAP

Roger-Rapid DNA-Extraction-kit

elektrokompetenter TG1 E.coli.-Stamm von Stratagene

LB-Medium

Elektroporator

LB-Agarplatten mit 1% Glucose: LB-Medium mit 1%Glucose und Ampicillin: LB-Medium mit 1,5% Bactoagar und 1% Glucose autoclavieren und nach dem Abkühlen auf ca.50°C Ampicillin zur Endkonzentration 100µg/ml dazugeben

### ***3.7 Material für die Maxipräparation von Bibliothek-DNA der Leicht- und Schwerekettengene und deren Verdau mit Restriktionsenzymen***

LB-medium mit 1% Glucose und Ampicillin

Qiagen Maxipreokit

10xBuffer 2

BSA

Restriktionsenzyme: SfiI und XhoI von MBI

Mineralöl

Shrimp-Alkaline-Phosphatase(SAP) von MBI

SAP-Buffer

### **3.8 *Material zur Vermehrung des Helferphagen***

Helferphage (M13KO7)

LMP-Agarose

LB-Medium und Agar Platten

TG1-E.Coli-Bakterien

Kanamycin

Ultrafilter mit 0,45µm Porenweite

### **3.9 *Materialien für den "Phagen-Rescue"***

LB-Medium mit 1% Glucose und Ampicillin

Helferphage(M13KO7)

LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin

20%PEG-2,5M NaCl (200g Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 8000 unit und 2,5mol NaCl auf 1l mit destilliertem Wasser auffüllen und unter Rühren auf etwa 50°C erwärmen bis sich alles gelöst hat )

PBSdef

### **3.10 *Materialien für das Screenen der Antikörperbibliothek auf positive Klone mittels Polymerase-Ketten-Reaktion und Restriktionsverdau***

PCR-Taq-core-Kit von Qiagen

Destilliertes Wasser

Primer Fdseq1        5`        GAA TTT TCT GTA TGA GG

Primer LMB3        5`        CAG GAA ACA GCT ATG ACC

NEB2 Buffer 10x

BSA

Restriktionsenzym BsrNI

Zahnstocher autoklaviert

50x TAE-Puffer:	Tris –HCl	242g
	Eisessig	57,1ml
	0,5M EDTA (pH 8,0 )	100ml
	ad 1l dH <sub>2</sub> O	

### ***3.11 Material zur Bestimmung des Phagentiters***

LB-Medium

Ampicillin

LB-Agar-Ampicillin-Platten

Zu bestimmende Phagen

Tg1-E.coli-Bakterien von Stratagene auf Minimalnährbodenplatten

### **3.12 Material zur Immunotubeselektion der Antikörperbibliothek**

Polysorb Immunotubes Nunc

Antigene:

- aufgereinigtes Lassavirus inaktiviert mit 1% NP40
- Lassavirus-GP2: rekombinant mit C-terminalem Histidin Tag in E.coli exprimiert und über Ni<sup>2+</sup>-Agarose-Säulenchromatographie aufgereinigt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Strecker und O. Lenz, Marburg; ter Meulen et al. Virology 2004)
- PfF2-Protein (Domäne des Plasmodium falciparum-Proteins EBA-175 welche Glykophorin A des humanen Erythrozytenrezeptor bindet) in E.coli exprimiert, renaturiert durch oxidative Rückfaltung und durch Eisen-Austausch und Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Herrn Chetan E. Chitnis, New Dehli; Pandey et al. Molecular&Biochemical Parasitology 2002)

PBSdef (wie PBS++ohne MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> )

2% Milchpulver in PBSdef gelöst

0,1% Tween 20 in PBSdef gelöst

1M Tris HCl pH 7,5

1mM Triethylamine (69µl Triethylamine in 5ml Wasser gelöst)

LB-Medium

LB-Medium mit 2% Glucose

Ampicillin

Kanamycin

Glycerol

Große und kleine LB-Agar-Platten mit 1% Glucose und Ampicillin

TG1-E.coli.-Bakterien von Stratagene auf Minimalnährbodenplatte

Helferphage

20%PEG-2,5M NaCl

### **3.13 Material für ELISA**

Polysorb-ELISA-Platten von der Firma Nunc

2%MPBS

PBSdef

PBSdef mit 0,1% Tween

Anti-Phagenantikörper M13 HRP-gekoppelt aus der Maus (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn R. Kontermann)

Antikörper polyklonal gegen Pff2-Protein aus der Maus (freundlicherweise von Herrn Chetan E. Chitnis, New Dehli zur Verfügung gestellt )

Antimaus-Antikörper HRP-gekoppelt der Firma Dako AS, Dänemark

ABTS Peroxidase Substrate und

Peroxidase Solution B von Kirkegaard & Perry Laboratories

### ***3.14 Materialien für die Sequenzierung von DNA***

Klon-PCR-Produkt aus Koloniescreening

Primer LMB3            5`        CAG GAA ACA GCT ATG ACC

TermMix

### ***3.15 Material zur Expression von monoklonalen Antikörperfragmenten***

Einzelne Kolonien E.coli HB2151-Stamm auf Minimal-Agarplatten gewachsen

LB-Medium

Gewünschter monoklonaler Phage zur Expression

IPTG

### ***3.16 Materialien zur elektrophoretischen Proteinauftrennung (SDS-PAGE)***

- Für das Gel :

1,5M Tris pH 8,8

0,5M Tris pH 6,8

SDS 10%

30% Acrylamid

APS

## TEMED

- Für das “Western-Blotten”:

Anodenpuffer I :	1M Tris	300ml
	Ethanol	200ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

Anodenpuffer II :	1M Tris	25ml
	Ethanol	200ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

Kathodenpuffer :	1M Tris	25ml
	Aminocapronsäure	5,25g
	Ethanol	200ml
		ad 1l dH <sub>2</sub> O

10xLaufpuffer :	SDS	10g
	Tris	30g
	Glycin	144g
		ad 1l dH <sub>2</sub> O



4xSDS-Probenpuffer :	0,5M Tris/HCl pH6,8	4ml
	SDS	0,4g
	Glycerin	4ml
	2% Bromphenolblau	0,1ml
	dH <sub>2</sub> O	1,2ml
	β-Mercaptoethanol	0,4ml

### ***3.17 Material zur in-vitro Kultivierung von P. falciparum in humanen Erythrozyten***

**(kultiviert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Frau Dr. Françoise Debierre-Grockiego)**

Grundmedium:	9,66g RPMI-Medium
	5,53g HEPES
	46,5 mg Hypoxanthin
	ad 930ml Wasser
	sterilfiltriert
Kulturmedium:	930ml Grundmedium
	40ml 5% NaHCO <sub>3</sub>
	10ml Neomycin-Lsg. 10mg/ml
	100ml Frischplasma fibrinausgefällt

Erythrozyten, zweimal mit PBS gewaschen und auf einen Hämatokrit von 50% eingestellt  
gasdichter Inkubator mit Gasgemisch (5% Sauerstoff, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Stickstoff)

PBS

Sorbitol-Lsg. 5%

Gelafundin (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)

### ***3.18 Materialien für die Durchflusszytometrie, "FACS"-Analyse***

PBSdef

2% Milchpulver in PBSdef gelöst

Antiphagenantikörper M13 HRP-gekoppelt aus der Maus (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn R. Kontermann)

anti-Maus-Antikörper FITC gekoppelt

„FACS“-Puffer

### ***3.19 Materialien für die Expression des Lassavirus-GP2***

pCDNA-GP2-transformierte Übernachtskultur von E.coli

LB-Medium

Ampicillin

IPTG

Puffer B

Puffer C

Puffer D

Puffer E

### ***3.20 Chemikalien***

Aceton

Acrylamid

Agarose

Bactoagar

BSA

DNA-Längenstandard: 100 bp und 1kb DNA-ladder von MBE

Ethanol

Ethidiumbromid

Glycerin

IPTG(Iso-Propyl-Thio-Galactosid )

Isopropanol

LMP-Agarose

Nitrocellulose-Membran

NP 40(Detergens)

Parafilm

Pepton

Polyethylenglykol (8000 unit)

Rainbow Marker (RPN 755 und 756 ) für Proteingele

Röntgenfilme: BIOMAX MR

SDS (Natriumdodecylsulfat )

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin )

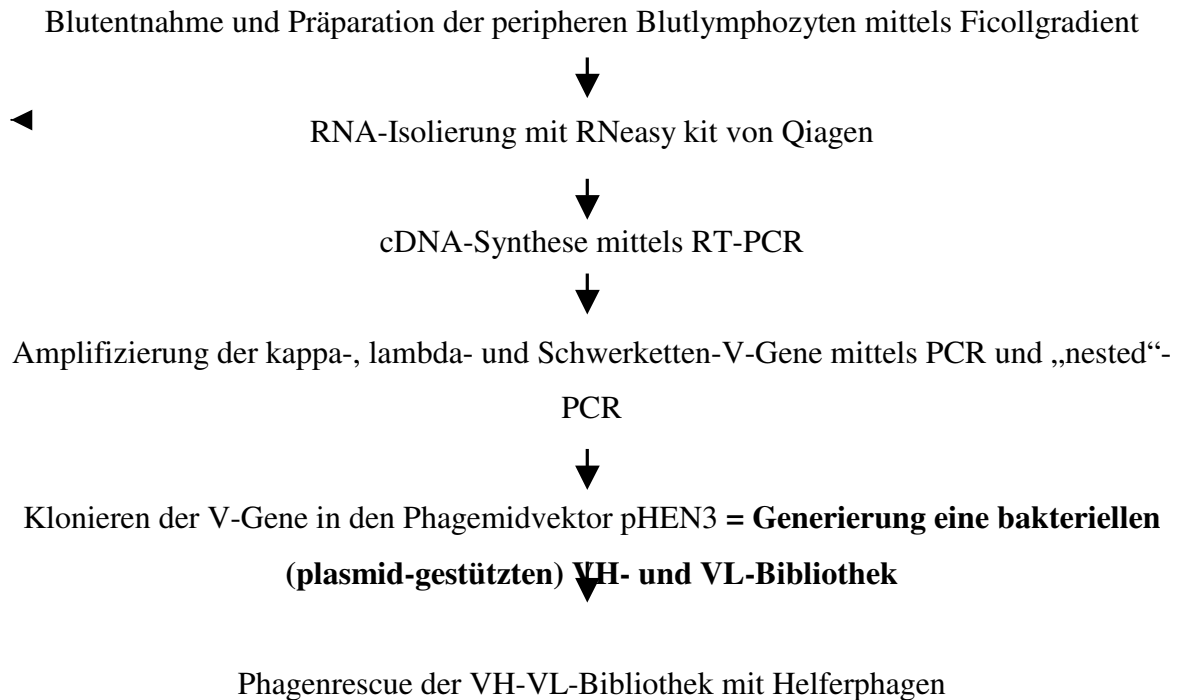
Tris (Trishydroxymethylaminomethan )

Tween 20

## 4 Methoden

### 4.1 Konstruktion der Phage-Display-Antikörperbibliothek

Abb. 3.1. soll in der Form eines „Flowchart“ einen Überblick über die Herstellung einer Patienten-Antikörper-Phagedisplay-Bibliothek geben.



**Abb. 4.1.:** Ablauf der Erstellung einer Patienten-Antikörper-Phagedisplay-Bibliothek

#### 4.1.1 Patientenauswahl zur Gewinnung der peripheren Blutlymphozyten

Es wurde Blut für die Präparation der peripheren Blutlymphozyten von einem Probanden aus Guinea, West Afrika entnommen. Der Proband hat mindestens eine Lassavirusinfektion durchgemacht, was durch Nachweis von Antikörpern, im ELISA, im Neutralisationstest und im T-Zellstimulationssassay bestätigt wurde (ter Meulen 2004). Der Proband hat des Weiteren mehrere Malariainfektionen durchlebt, was ebenfalls durch den Immunfluoreszenz mit seinem Serum nachgewiesen wurde (siehe Ergebnisse).

#### 4.1.2 Gewinnung peripherer-Blut-Lymphozyten (PBL)

In zwei 50 ml Falcontubes mit 12,5 ml Ficoll wurden mit 20ml Vollblut des Probanden überschichtet und sofort bei 2000rpm für 20min. bei 4°C zentrifugiert. Die Zentrifuge wurde hierbei nicht gebremst. Dann wurde die Zellen enthaltende Schicht abpipettiert, in frische 50ml Tubes überführt und mit der jeweils doppelten Menge PBS gut durchmischt. Es wurde erneut sofort für 8min. bei 1300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit PBS auf 14ml in einem neuen Tube aufgefüllt und durchmischt. Erneutes zentrifugieren. Der Überstand wurde erneut vorsichtig abgenommen und mit PBS auf genau 1ml expandiert, um eine möglichst exakte Zellzählung zu ermöglichen. Ein Aliquot der Zellen wurden nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer gezählt und die Zellkonzentration entsprechend hochgerechnet. Die Zellen wurden nun so schnell wie möglich bei -70°C in DMSO/FCS eingefroren.

#### 4.1.3 Isolation der RNA aus den PBL

Die gradientenangereicherten Lymphozyten wurden bei 2000rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und dann zweimal mit PBS++ gewaschen. Der PBS++ Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 750µl RLT-Puffer+β-Mercaptoethanol-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen 20sec lang auf Stufe 6 im Fastprep FP120-Schredder in FastRNA-Tubes-Green, lysiert und auf Eis gestellt. Nach dem Abkühlen wurde 700µl 70%-iger Ethanol dazugegeben und das Lysat auf Rneasy-mini-columns geladen und für 15sec zentrifugiert. Nach dem Wechseln des Sammelgefäßes wurden 500µl RPE-Puffer dazugegeben, erneut zentrifugiert und nach dem Wechsel des Sammelgefäßes die RNA ,mit 40µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### 4.1.4 Synthese der cDNA

Es wurden acht Reaktionsgefäße angesetzt: Zu einem Mastermix bestehend aus 4µl oligo-dT(15)-Primer , 3,6µl 10mM dNTPmix, 2µl RNasin, 4µl 10x RT-Puffer, 4µl 0,1 M DTT, 1,5µl MMLV reverse Transkriptase Stratagene (50 u/µl ) und 11,9µl H<sub>2</sub>O wurden 8µl eluierte RNA aus Schritt D.1.3. gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert, dann bei 95°C für 10 Minuten denaturiert und dann bei -80°C eingefroren.

Das Prinzip der Synthese von cDNA durch reverse Transkription: Eukaryote mRNA besitzt einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende an welchen der verwendete oligo(dT)15Primer hybridisiert. Die Reverse-Transkriptase MMLV stammt aus dem Moloney murine leukemia

Virus und synthetisiert RNA-abhängig DNA. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 37°C. Sie synthetisiert die cDNA vom 5'-3'-Ende (bezogen auf den entstehenden DNA-Strang).

#### **4.1.5 Amplifikation der Gene für die variablen Bereiche der leichten Antikörperketten ( V-kappa, V-lambda ) und der schweren Antikörperketten**

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifikation der variablen Regionen der Antikörpergene wurde zuerst eine konventionelle PCR durchgeführt mit einem Reaktionsgemisch aus: 1µl der cDNA aus D.1.4., 0,5µl Taq Polymerase, 1µl dNTPs, 5µl 10xPuffer, jeweils 2µl der forward und backward-Primer und H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 50µl pro Reaktionsansatz. In einem parallelen Reaktionsansatz wurde noch 10µl der im Kit mitgelieferten Q-Lösung zu jedem Ansatz dazugegeben. Laut Hersteller sollte diese die Ausbeute an Amplifikaten, durch Verminderung der Stringenz der Reaktionsbedingungen, erhöhen. Danach erfolgte eine "nested"-PCR zur weiteren Vermehrung der Amplifikate aus der ersten Reaktion, und zur Einführung von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme ApaL1, NotI, SfiI und XhoI in die PCR-Produkte.

Je fünf Mikroliter der PCR-Produkte wurden dann in 1,5%igen Agarosegelen mit je einem Mikroliter Probenpuffer(6x) elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert.

Zum Prinzip der PCR und "nested"-PCR:

Das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermophilus-aquaticus* synthetisiert beginnend an einem an Template-DNA hybridisierten Oligonukleotidprimer komplementäre DNA in 5'-3'-Richtung. Es werden zwei Primer eingesetzt, die jeweils am 5'-Ende der komplementären DNA-Stränge des gewünschten Gens binden. Nach 30-40-maliger Wiederholung eines Zyklus, bestehend aus Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Syntheseschritten, wird der gewünschte DNA-Abschnitt exponentiell vermehrt. Nach 20 Synthesesyklen entstehen so ca. 10<sup>6</sup> Moleküle, welche im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können. Eine "nested"-PCR wird durchgeführt um selbst sehr geringe Mengen an gesuchter DNA zu vermehren, da bei alleiniger Erhöhung der Zyklenzahl die Menge an PCR-Fehlprodukten, u.a. durch Fehlhybridisierungen, zunimmt und es außerdem zu einer Sättigung der Reaktion nach mehr als 35 Zyklen kommt. Für die "nested"-PCR werden Primerpaare verwendet, die an die Produkte der ersten PCR hybridisieren und diese so nochmals vermehrt werden können. Mit der Kombination von reverser Transkription und PCR können auch sog. "low-abundant"

mRNAs, d.h. Gentranskripte, die in dieser Zelle gerade nur in kleiner Zahl vorliegen, amplifiziert werden.

#### **4.1.6 Verdau der PCR-Produkte aus Punkt 4.1.5. mit Restriktionsenzymen und Reinigungsmethoden**

Die Amplifikate der Kappa-V-Gene und der Lambda-V-Gene wurden erst über Qiagen spin columns nach Kit-Protokoll aufgereinigt, in 43,5µl dH<sub>2</sub>O eluiert und nach Zugabe von 5µl Reaktionspuffer(10x), 0,5µl BSA und 1µl des Restriktionsenzym ApaL1 über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde dann mit dem Roger Rapid Kit der Firma Bodelta präzipitiert und wiederum in 43,5µl Wasser aufgenommen. Dann wurden 5µl Reaktionspuffer(10x), 0,5µl BSA und 1µl des Restriktionsenzym NotI dazugeben und für 6h bei 37°C inkubiert. Die durch den Verdau entstandenen Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, die Banden mit der erwarteten Größe von 350bp ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiagen Gelextraktionskit nach Herstellerprotokoll wiedergewonnen.

Die Amplifikate der Schwerketten-V-Gene wurde ebenfalls zunächst mit Qiagen spin columns aufgereinigt, in 43,5µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und nach Zugabe von 5µl Reaktionspuffer(10x), 0,5µl BSA und 1µl des Restriktionsenzym SfiI über Nacht bei 50°C inkubiert. Bei diesem Restriktionsverdau wurden die Proben mit Mineralöl überschichtet um ein Verdampfen und Kondensieren am Reaktionsgefäßdeckel zu verhindern. Am nächsten Tag wurden 1µl XhoI dazugegeben und für 6h bei 37°C inkubiert. Die geschnittenen DNA Fragmente wurden wiederum aus einem 1%igen Agarosegel bei 350bp extrahiert.

#### **4.1.7 Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3 und dessen Restriktionsverdau**

100µl Z-kompetente E.coli-DH5α wurden mit 1µl der Vektor-DNA pHEN3 transformiert: Die DNA wurde zu den auf Eis stehenden Bakterien pipettiert, vorsichtig durchmischt und eine Stunde inkubiert. Dann wurden 3ml LB-Medium mit den transformierten Bakterien angeimpft und diese Vorkultur bei 37°C für 8h schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 500ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Das LB-Medium enthielt zusätzlich 1% Glukose und das Antibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml. Am nächsten Tag wurde die pHEN3 DNA mit dem Maxiprep-Kit der Firma Qiagen präpariert. Die Plasmid-DNA Präparation mit diesem Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterien und der Adsorption von DNA an Anionenaustauschersäulen in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die Konzentration der

DNA wurde mit Hilfe des Photometers bei einer 1:50 Verdünnung bestimmt. Dabei geht man davon aus, dass doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50µg/ml in Wasser bei einer Wellenlänge von 260nm einen Extinktionswert von eins ergibt.

Die so gewonnene Vektor-DNA wurde in Aliquots zu 20µg im jeweiligen Gesamtvolumen von 100µl mit den Restriktionsenzymen ApaI und NotI verdaut. Zuerst erfolgte der Verdau mit dem Restriktionsenzym ApaI über Nacht bei 37°C und dann nach Präzipitation mit dem Roger Rapid Kit, für 6h bei 37°C der Verdau mit NotI. Nach dem Restriktionsverdau wurde der Vektor wieder mit dem Roger Rapid Kit präzipitiert, in der Speedvac getrocknet und in 90µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Um eine Religation mit seinen eigenen verdauten Enden zu verhindern wurde der Vektor noch mit Shrimp-alkaline-Phosphatase(SAP) behandelt: Zu 90µl Vektorlösung wurden 1µl SAP und 10µl 10x dephosphorylierungs Puffer gegeben und die Mischung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde erneut ein Mikroliter SAP dazugegeben und für weitere 30 min. inkubiert. Die Shrimp-alkaline-Phosphatase kann durch Erhitzen auf 65°C für 20 min. inaktiviert werden. Sie dephosphoryliert die verdaute Vektor-DNA am 5'-Ende, so dass eine Ligation der Vektorenden mit sich selbst nicht stattfinden kann. Das hineinzuklonierende Fragment kann mit seinem phosphorylierten 5'-Ende mit der Vektor-DNA ligieren. Nun wurde die Vektor-DNA Chloroform-extrahiert: Zu jedem Eppendorfcup mit 100µl Inhalt wurden 100µl einer Mischung von Phenol, Chloroform und Amylalkohol gegeben und nach gründlichem Vortexen für eine Minute bei 9000rpm zentrifugiert. Die oben aufschwimmende wässrige Phase (Überstand) und die hydrophobe phenolische Phase (Bodenfraktion) wurden getrennt weiterbehandelt. Zum Überstand wurden 100µl Wasser und 200µl der Phenol-Chloroform-Amylalkoholmischung gegeben und nach gründlichem Vortexen und zentrifugieren der neue Überstand aufgehoben. Aus der Bodenfraktion wurde DNA mit 100µl dH<sub>2</sub>O nach Vortexen und Zentrifugieren nochmals extrahiert um die Ausbeute an DNA zu erhöhen. Zu diesen zwei gesammelten Überständen, 300µl je Ausgangsportion, wurde 300µl Chlorophorm pipettiert und der hier sich nach vortexen und Zentrifugieren bildende Überstand mit 750µl Roger Rapid-Lösung nach Protokoll präzipitiert und in 20µl Wasser gelöst. Aliquots von 3µl des klonierungsbreiten Vektors wurden in 1,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und photographiert um orientierend die Qualität und Quantität des Vektors zu überprüfen.

Die „multiple-cloning-site“ des Vektors ist in Abb. 3.2. dargestellt. Die Leichtkettengene kappa und lambda werden in die Schnittstellen zwischen ApaI und NotI legiert, die Schwerkettengene zwischen SfiI und XhoI. Der His-Tag kann später zur Aufreinigung der exprimierten Fragmente mittels z.B.Ni-NTA-Agarose dienen oder wie der myc-Tag zum



Nachweis mittels eines Antikörpers. Zudem besitzt der Vektor Primerbindungsstellen für LMB3 und fdSeq1 zur Überprüfung der Klonierung und ein Amber-Stopkodon zur Termination der Proteinsynthese.

```

-----LMB3-----→                HindIII                RBS
ca gga aac agc tat gac cat gat tac gcc aag ctt tct aga gca tgc aaa ttc tat ttc aag gag aca gtc ata
                                                SfiI      NcoI
atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta ctc gcg gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg
                        XhoI
cag ctg cag gtcg acc tcg agt ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt gga ggg agt ggt
                ApaLI                NotI                His-Tag
gga ggc agt gca cag gtc caa ctg cag gag ctc gat atc aaa cgg gcg gcc gca cat cat cat cat cat cac
                        Myc-Tag                amber
ggg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggg gcc gca tag act gtt gaa agt tgt tta
      ←---fdSeq1-----
gca aaa cct cat aca gaa aat tca ...

```

**Abb. 4.2:** Die „cloning-site“ des verwendeten Vektors pHEN3

#### 4.1.8 Klonierung der Leichtketten-V-Gene in den Phagemidvektor pHEN3

Für die jeweiligen Ligationsansätze wurden 10µg Vektor pHEN3 benötigt. Da Portionen von 20µg Vektor in den Verdau und Reinigungsschritten eingesetzt wurden und ein technisch bedingter Verlust von zehn Prozent angenommen wurde, befanden sich noch etwa 18µg klonierungsfertige Vektorpräparation in 20µl dH<sub>2</sub>O. Es wurden also pro Ligationsansatz 12µl Vektorlösung verwendet. Die Ligationen wurden folgendermaßen zusammenpipettiert:

Für die kappa-Leichtketten-V-Gene:

Jeweils 10µl der fertigen Inserts 1-6

10µl Ligationspuffer

2µl Ligase

12µl pHEN3

dH<sub>2</sub>O ad 100µl

Für die lambda-Leichtketten-V-Gene wurden jeweils 11µl verdaute Inserts, und 13µl pHEN3 zu einem Gesamtvolumen von 114µl Reaktionsgemisch zusammengegeben. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 15°C im Wasserbad inkubiert und am nächsten Tag

mit 500µl Roger Rapid-Lösung präzipitiert und mit 300µl Ethanol gefällt. Die DNA wurde in 10µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

Nun wurden elektrokompente TG1 E. coli-Bakterien der Firma Stratagene mit der DNA durch Elektroporation transformiert. Wenn man eine Mischung von DNA und Zellen kurzzeitig starken elektrischen Feldern aussetzt kann die DNA durch sich kurzzeitig bildende Öffnungen in der Bakterienzellwand eindringen und das Bakterium somit genetisch verändern. Es wurden die Kappa und die Lambda Bibliotheken jeweils getrennt elektroporiert. 20µl DNA jeder Linie wurden zu jeweils 150µl TG1 Bakterien pipettiert und diese 170µl auf drei Elektroporationsküvetten verteilt im Elektroporator verarbeitet. Sofort nachdem das Hochspannungsfeld anlag wurden die Bakterien in jeweils einem Milliliter LB-Medium aufgenommen und für Kappa und Lambda getrennt in Falcontubes gepoolt. Nach einer Wachstumszeit von einer Stunde bei 37°C in der sich die Bakterien vom Elektroporationsschock erholen sollten, wurden sie für fünf Minuten bei 2500rpm abzentrifugiert und in 500µl LB-Medium resuspendiert und auf eine große LB-Amp-Glucose-Platte ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Man wählt die niedrigere Temperatur als die üblichen 37°C, um ein Überwuchern von Bakterien, die einen Vektor ohne Insert aufgenommen haben und dadurch einen Wachstumsvorteil haben könnten, zu verhindern.

Am nächsten Tag wurden die Bakterien mit 8ml LB-Medium aufgenommen. Es wurden zur Sicherheit mehrere Glycerolstocks weg gefroren. Dazu werden 850µl Bakteriensuspension mit 150µl autoklaviertem Glycerol vermischt und bei -80°C eingefroren.

#### **4.1.9 DNA-Präparation aus den Leichtketten-Bibliotheken in großem Maßstab**

Es wurden zwei mal 500ml LB-Medium-Ampicillin-1%Glucose je Bibliothek (Leichtketten und Schwerkettenbibliothek) mit jeweils 5ml der geernteten Bakterien inokuliert und über Nacht bei 30°C wachsen gelassen, um am nächsten Tag die pHEN3-kappa und pHEN3-lambda- DNA nach standard Maxipräparationsprotokoll zu gewinnen. Es wurde das Hispeed-Maxiprep-Kit der Firma Qiagen verwendet.

Um die Schwerketten-V-Gene in die pHEN3-kappa- und pHEN3-Lambda-Bibliotheken hinein klonieren zu können, mussten diese mit den Restriktionsenzymen SfiI und XhoI verdaut werden:

Verdau der kappa-Bibliothek: In der maxipräparierten DNA der pHEN3-kappa-Bibliothek wurde eine Konzentration von 0,225µg/µl gemessen. Da für den Verdau 10-20µg DNA zum Einsatz kommen sollten ergab sich folgende Reaktionsmischung:

80µl pHEN3-kappa-Bibliothek-DNA

10µl 10xPuffer 2

1µl BSA

2µl SfiI

7µl H<sub>2</sub>O

Verdau der lambda-Bibliothek: Aufgrund der DNA-Konzentration von 0,207µg/µl in der maxipreparierten pHEN3-lambda-Bibliothek wurden hier 85µl pHEN3-lambda-Bibliothek-DNA und entsprechend weniger Wasser zu einem Gesamtvolumen von 100µl verwendet.

Die Reaktionsmischungen wurden mit Mineralöl überschichtet um ein Evaporieren und Kondensieren des Wassers zu verhindern und bei 50°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2µl XhoI hinzu pipettiert und für 6h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 90µl dH<sub>2</sub>O wurden die geschnittenen Vektoren wie beschrieben mit Shrimp-Alkaline-Phosphatase behandelt, zweifach Phenol-Chloroform Extrahiert, mit dem Roger-Rapid-Kit präzipitiert und in 20µl Wasser resuspendiert.

#### **4.1.10 Klonierung der Schwarketten-V-Gene in die pHEN3-kappa und pHEN3-lambda-Bibliotheken**

Es wurden Ligationsansätze getrennt für die kappa- und lambda-Bibliotheken angesetzt. 20µl verdaute Bibliotheken wurden mit jeweils 8µl der geschnittenen Inserts 18-25, 10µl Reaktionspuffer(10x), 2µl T4-Ligase und dH<sub>2</sub>O vermischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Es wurde dann mit jeweils 500µl Roger-Rapid-Lösung präzipitiert und in 10µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Danach wurden TG1-elektrokompetente E.coli-Bakterien nach oben beschriebenem Protokoll mit der fertig ligierten DNA elektroporiert, auf große LB-Ampicillin-Glucose-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C wachsen gelassen. Die Bibliothekengröße wird mit Verdünnungsreihen bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot von 10µl der elektroporierten Bakterien in 990µl LB-Medium verdünnt und davon jeweils 100µl auf kleine Nährbodenplatten ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien werden gezählt und die Anzahl der Bakterien in der Ausgangslösung berechnet.

#### **4.1.11 Herstellung des Helferphagen**

Um den Phagenrescue zu ermöglichen musste zunächst der Helferphage aus einem Ursprungs-Stock vermehrt werden (Kontermann und Dübel 2001):

Jeweils 100µl einer Verdünnungsreihe von Helferphagen wurde mit jeweils 100µl TG1 Bakterienkultur in logarithmischer Phase(OD<sub>600</sub>=0,5) und 3ml Top-Agar mit 42°C gemischt, auf LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag

wurde ein Plaque aufgenommen, zu 3ml einer TG1-Bakterien-Übernachtskultur gegeben und für 3 h geschüttelt. Mit diesem Ansatz wurden 500ml LB-Medium inokuliert und nach einer Stunde Schütteln bei 37°C mit 25µg/ml Kanamycin versetzt. Nachdem dieser Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert wurde, wurde für 30 min. bei 6000rpm abzentrifugiert und der Überstand, welcher den Helferphagen enthielt, abfiltriert (0,45µm Porenweite). Die filtrierten Phagen wurden nun bei -80°C eingefroren.

#### **4.1.12 Phagenrescue in großem Maßstab**

Alle Bakterienkolonien von den großen LB-Ampicillin-Glucose-Platten wurden in 8ml LB-Medium aufgenommen und es wurden Glycerolstocks bei -80°C eingefroren. Dann wurden jeweils 100ml LB-medium mit Glucose und Ampicillin mit solch einer Menge Bakterien angeimpft, dass sich eine optische Dichte von ca. 0,1 ergab und diese Kulturen bei 37°C solange wachsen gelassen bis eine OD von 0,5 erreicht wurde. Nun wurden 100µl der Helferphagen-Lösung zu den Kulturen gegeben, 30 Minuten bei 37°C stehen gelassen und 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Bei einer optischen Dichte von 0,5 befinden sich die TG1 Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase in der sie Pili ausbilden über welche sie besonders gut Phagen aufnehmen können. Die Helferphagen lagern sich in der Ruhephase an die Bakterienwand an und penetrieren dann in der darauf folgenden Schüttelphase. Die Zugabe des Helferphagen ist nötig, da der Phagemidvektor pHEN3 ein defektes Phagen genom enthält und der Helferphage die ergänzenden Gene zu Phagenvermehrung mitbringt.

Anschließend wurden die Kulturen zehn Minuten bei 3500rpm abzentrifugiert und die Pellets in jeweils einem Liter LB-Medium mit Ampicillin und Kanamycin resuspendiert und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Der Helferphage vermittelt den Bakterien eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Da der Phagemidvektor pHEN3 den Bakterien bereits Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt hat, werden in der Kultur nun nur noch Bakterien wachsen können, die sowohl Phagemidvektor als auch Helferphagen aufgenommen haben. Am nächsten Tag wurden die Kulturen 30 Minuten bei 6000rpm abzentrifugiert, um sie von Bakterien und deren Debris zu befreien. Im Überstand befanden sich nun die Phagen. Um diese zu gewinnen wurde je ein Liter der Überstände mit 250 ml PEG-NaCl versetzt und für 2h bei 4°C gerührt um die Phagen auszufällen. Nun wurde erneut zentrifugiert und die Phagen befanden sich im Pellet. Dieses wurde in 40ml PBSdef aufgenommen, zehn Minuten bei 3500rpm zentrifugiert und der Überstand erneut mit PEG-NaCl versetzt (8ml). Es wurde erneut bei 4°C gerührt und danach nochmals abzentrifugiert.

Das Pellet enthielt nun die Phagen und wurde in 4ml PBSdef aufgenommen und in 1ml Aliquots bei -80°C eingefroren. Polyethylenglykol fällt hochmolekulare Substanzen aus, in diesem Fall Phagen, während niedermolekulare Substanzen nicht ausgefällt werden. Die hohe Konzentration von Natriumchlorid ist nötig um die Phagen von Bakteriendebris zu trennen und ermöglicht eine optimale Fällung durch das PEG.

#### 4.1.13 Kolonie-PCR zum Screening auf Phagemide, die beide V-Regionen tragen

Um die Effizienz der Klonierung der V-Regionen-Gene in pHEN3 und damit die Qualität der Bibliothek zu überprüfen, wurde eine Serie von Kolonie-PCRs durchgeführt. Es wurde ein Primerpaar, das die Klonierungsstelle flankiert in den Reaktionen eingesetzt, so dass sich je nach dazwischen liegendem Insert ein größeres oder kleineres PCR-Fragment ergibt, je nachdem ob beide Fragmente( VH und VI) in den Vektor kloniert wurden oder nicht. Es wurde zunächst ein PCR-Mastermix hergestellt :

Puffer 10x	2µl
Q-Lösung	4µl
dNTPs	0,5µl
Primer LMB3	1µl
Primer fdSeq	1µl
Taq-Polymerase	0,3µl
dH <sub>2</sub> O	11,2µl

(Die Grundquantitäten wurden mit der Zahl der durchzuführenden Kolonie-PCRs multipliziert.)

Dann wurde mit sterilisierten Holzzahnstochern in einzelne Kolonien gestochen und eine kleine Menge Bakterien in jeweils 20µl des Mastermixes eingerührt. Die Proben wurden im PCR-Block folgendem Syntheseprogramm unterzogen:

Denaturierung und Aufschließen der Bakterien zur Freisetzung der Plasmide bei 95°C für 10 Minuten, dann folgten 35 Zyklen aus 15 Sekunden 95°C Denaturierung, 30 Sekunden 50°C Annealing und 45 Sekunden 72°C Synthese. Zum Schluss wurden noch zehn Minuten Syntheszeit bei 72°C angehängt, unter der Vorstellung, dass die Taq-Polymerase unfertige DNA-Stränge ergänzt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden in 1,5% Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und Banden bei 900 kB als positiver Klon, d.h. beide Inserts tragender Phagemidvektor pHEN3 , gewertet und gezählt.

#### **4.1.14 Bestimmung des Titers einer Phagenlösung**

Das Prinzip der Titerbestimmung einer Phagen-enthaltenden Lösung besteht darin, dass man eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung anfertigt und diese dann zu einem Überschuss infizierbarer Bakterien gibt. Die Bakterien können dann durch die von den Phagen vermittelte Antibiotikaresistenz auf antibiotikahaltigen Nährböden wachsen und es kann aus der Anzahl der erhaltenen Kolonien und dem Verdünnungsfaktor der Phagentiter ermittelt werden.

Es wurde am Vorabend eine Kolonie TG1- Bakterien von einer Minimalplatte gepickt und diese in ca. 3ml LB-Medium bei 37°C über Nacht vermehrt. Da bei diesem Arbeitsschritt kein Antibiotikum zugesetzt wird, wurde jeweils auch LB-Medium nur mit einem sterilen Zahnstocher über Nacht als Sterilitätskontrolle bebrütet. Am nächsten Tag wurden 50ml LB-Medium mit 1ml der Startkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,45 wachsen gelassen. In der Zwischenzeit wurden Phagenverdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-10}$  angefertigt. Jeweils 100µl der Verdünnungen wurde zu jeweils 900µl der TG1 Kultur gegeben und bei 37°C für 30 Minuten stehend dann 30 Minuten schüttelnd inkubiert. Dann wurden 100µl jeder phageninfizierter TG1-Suspension auf kleine LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Kolonien auf den Platten gezählt, auf denen sie einzeln zählbar waren, und der Phagentiter zurückgerechnet.

## **4.2 *Antigene und deren Präparationen zur Immun-Selektion***

### **4.2.1 Präparation von inaktiviertem Lassavirus für die Immunotube-Selektion**

Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr.med. J. ter Meulen in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe 4 durchgeführt. Nach der Kultivierung der Viren in Verozellen wurde der Zellkulturüberstand für zwei Stunden in einem SW28-Rotor bei 22000 rpm durch ein 25%-iges Glycerolkissen pelletiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert und die Viren mit 1% NP40 für drei Stunden bei 56°C inaktiviert.

### **4.2.2 Präparation von rekombinantem Lassavirus-GP2 für die Immunotube-Selektion**

Das Lassavirusglykoprotein GP2 wurde mittels eines Expressionsplasmids (pCDNA-GP2) bakteriell exprimiert. Dazu wurde ein Liter LB-Medium mit Ampicillin mit zehn Milliliter einer pCDNA-GP2-transformierten Übernachtstartkultur angeimpft und bis zu einer OD bei 600nm von 0,6 wachsen gelassen. Es wurde dann mit IPTG in einer Konzentration von 2mM induziert. Nach weiteren vier Stunden Wachstum wurde die Kultur für 15 Minuten bei 5000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40ml Puffer B aufgenommen und für eine

halbe Stunde gerührt. Es wurde nun intensiv mittels Ultraschall lysiert und für 30 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert um den Bakteriendebris zu beseitigen. Der Überstand wurde mit einem Milliliter Ni-NTA-Agarose versetzt und für eine Stunde auf dem Taumler bewegt. Die Mischung wurde in eine Säule überführt. Es wurde nun mit 25ml Puffer C gewaschen und dann mit 100ml PufferD, um das Protein dann mit zehn Milliliter Puffer E in ein Milliliter Fraktionen zu eluieren.

#### **4.2.3 Präparation von rekombinantem Plasmodium-Falciparum-Protein PfF2 für die Immunotube-Selektion**

Die Herstellung des PfF2 erfolgte durch die Arbeitsgruppe unter Chetan E. Chitnis der Malaria Research Group im International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology in New Delhi. Das DNA Fragment für PfF2 wurde amplifiziert und mit Hilfe des E.coli Expressionsvektors pET28a+ nach IPTG-Induktion das Protein exprimiert. Das Protein wurde dann über Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Das PfF2 wurde dann in seine natürliche Struktur zurückgefaltet indem es mit einem speziellen Puffer versetzt wurde, der sich wie folgt zusammensetzte: 50mM Phosphatpuffer mit pH 5,8, 2mM reduziertes Gluthation, 0,2 nM oxidiertes Gluthation, 1M Harnstoff und 0,5 M Arginin. Danach wurde dialysiert um das Arginin zu entfernen und über SP-Sepharose Säulen und Gelfiltration weiter aufgereinigt (Chitnis C. et al 2002).

#### **4.2.4 In-vitro-Kultivierung von P. falciparum in humanen Erythrozyten**

(Die Herstellung und Anreicherung von P. falciparum infizierten humanen Erythrozyten im Merozoiten-Stadium wurde freundlicherweise von Frau Dr. Françoise Debierre-Grockiego durchgeführt.)

Die Plasmodium (Stämme Bandia und PebER) infizierten Erythrozyten wurden im oben genannten Kulturmedium in einem gasdichten Inkubator in einem speziellen Gasgemisch (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 90% N<sub>2</sub>) inkubiert. Es erfolgt ein täglicher Mediumwechsel und die Synchronisation der Kulturen. Zur Synchronisation werden die Kulturen abzentrifugiert und das Sediment in 5% Sorbitol zu einem Hämatokrit von 10% aufgenommen um Schizonten und Trophozoiten zu lysieren. Es überleben so nur die intraerythrozytären Ringformen. Zur Kontrolle der Kulturen können Ausstriche luftgetrocknet und dann Giemsa-gefärbt unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Um Knob enthaltende Erythrozyten zur erhalten werden unsynchronisierte Kulturen bei 2300 rpm abzentrifugiert und das Pellet in einer Mischung aus Kulturmedium und Gelafundin

(Verhältnis 1,4 zu 2,4) resuspendiert. In dieser Mischung sedimentieren nichtinfizierte Erythrozyten und Ringformen, die Knob-bildenden Erythrozyten schwimmen auf. Es wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und der Überstand abgenommen. Nach weiterem Abzentrifugieren wurden die Knob enthaltenden Erythrozyten in PBS aufgenommen.

### ***4.3 Antikörpernachweise in den Seren des verwendeten Lymphozytenspenders***

#### **4.3.1 Nachweis von Antikörpern gegen das Plasmodium Falciparum Protein PfF2 in Patientenseren mittels ELISA und Westernblot-Analyse**

**ELISA:** Es wurde das Plasmodium Falciparum Protein PfF2 in Nunc Maxisorb ELISA-Platten gecoatet. Dazu wurde es in 50mM Phosphatpuffer verdünnt zu Konzentrationen von 12,5µg/µl und 25µg/µl und in Portionen von 100µl in die ELISA-Platten-Wells über Nacht pipettiert. Am nächsten Tag wurde einmal mit PBSdef gewaschen und zwei Stunden mit 2%MPBS geblockt, um dann 100µl der Antikörperverdünnungen aufzutragen. Es wurden folgende Antikörper verwendet:

Polyklonales Mausserum anti PfF2, in Verdünnungen von 1:400, 1:800

Serum nicht spezifisch immunisierter Maus 1:400 verdünnt

Humanserum des Lymphozytenspenders für die rekombinante Antikörperbibliothek 1:800 verdünnt

Die Seren wurden in 2%MPBS verdünnt. Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die ELISA-Platten-Wells wurden dann sechs Mal mit PBSdef/0,1% Tween gewaschen um dann den Zweitantikörper antihuman-HRP( 1:800 inMPBS verdünnt) aufzutragen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der ELISA wieder sechs Mal gewaschen und mit 100µl ABTS/ Peroxidase Färbelösung im Verhältnis 1:1 gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Photometers bei 405nm.

**Westernblot-Analyse:** Zunächst wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von lysierten Plasmodium-falciparum infizierten Erythrozyten, von nichtinfizierten Erythrozyten und vom PfF2 Protein durchgeführt. Mittels SDS-PAGE lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgrund ihrer Masse und Ladung elektrophoretisch auftrennen. Das zu trennende Protein wird in SDS und Mercaptoethanol-Lösung aufgenommen und aufgeköcht, um nichtkovalente Bindungen und Disulfidbrücken aufzuheben, dann wird es nach hochtourigem Abzentrifugieren in die Taschen des



Sammelgels pipettiert. Zur Elektrophorese wurden Keutz-Miniprotein Gelkammern verwendet, und die Pufferkammern mit 1x Laufpuffer gefüllt. Es wurde etwa 60 Minuten bei 150 Volt aufgetrennt. Danach wurden die Proteine elektrophoretisch auf Nitrozellulose-Membranen übertragen. Die durch SDS bei  $\text{pH} > 7$  negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld aus dem Gel in Richtung Anode und bleiben irreversibel auf der Nitrozellulose-Membran haften. Zwischen der Anode und der Kathode wurde der Blot wie folgt aufgebaut: sechs Filterpapiere in Anodenpuffer I, drei Filterpapiere in Anodenpuffer II, Nitrozellulosemembran in Wasser getränkt, lagen über dem proteintragenden Trenngel, welches auf neun mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren zur Kathode hin lag. Die Filterpapiere und die Nitrozellulose-Membran wurden auf eine Größe von 6cmx9cm zurechtgeschnitten. Für das Elektroblothing wurden Blotkammern der Firma Keutz verwendet. Pro Gel wurde eine Stromstärke von 43mA angelegt. Die Blotting-Dauer betrug eine Stunde. Die Blots wurden kurzzeitig in 2%igem MilchpulverPBS abgesättigt. Zur Sichtbarmachung der Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurde diese mit Verdünnungen spezifischer Kaninchenantikörper inkubiert. Umgekehrt wurden auch Antikörper in Humanserumverdünnungen gegen die geblotteten Proteine durch Inkubation der Membranen mit diesen nachgewiesen. Die Blotmembranen wurden zwei Stunden mit den Erstantikörpern inkubiert, die in 2%igem Milchpulver-PBS verdünnt (Verdünnung 1:1000) wurden. Es handelte sich um Humanserum, von drei Personen aus einem hochendemischen Malariagebiet, deren B-Lymphozyten ebenfalls zur Erstellung von weiteren rekombinanten Antikörperbibliotheken verwendet wurden. Danach wurden die Blots eine Stunde mit HRP-konjugierten-Zweitantikörpern inkubiert: anti-Human-HRP 1:2000 und anti-Kaninchen-HRP 1:3000 in 2% MPBS. Gebundene HRP-gekoppelte Antikörper wurden dann mit verstärkter Chemilumineszenz nachgewiesen, wozu die Kits "Super Signal" und "Super Signal Ultra" der Firma Pierce verwendet wurden. Die entstandene Lichtemission der entsprechenden Banden wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes (Biomax, Fa. Kodak) detektiert und dokumentiert. Zwischen den Antikörper-Inkubationen wurden die Blots jeweils drei Mal kurz und dreimal für zehn Minuten mit PBSdef 0,1% Tween gewaschen.

#### **4.3.2 Nachweis von Antikörpern gegen Oberflächenantigene auf Plasmodium-Falciparum-infizierten Erythrozyten in Patientenserum mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Die Vertiefungen von Zehnfelder-Immunfluoreszenz-Objektträgern wurden mit Plasmodium-Falciparum infizierten Erythrozyten oder nicht infizierten Erythrozyten beschichtet, so dass sich etwa eine Schicht Zellen auf ihnen befand. Nach Lufttrocknung und Fixation in eiskaltem

Azeton wurden die Objektträger mit Humanserumverdünnung 1:70 eine Stunde inkubiert. Dann wurden die Objektträger zwei mal fünf Minuten in PBS gewaschen und mit antihuman-FITC- Antikörpern für weitere 30 Minuten inkubiert. Die Objektträger wurden nochmal gewaschen, mit Deckgläschen bedeckt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

#### **4.4 Immunselektion**

##### **4.4.1 Methode der Immunotube Selektion**

Es wurden pro Antigen drei oder vier Immunotube-Selektionsrunden durchgeführt um diejenigen Phagen anzureichern, die scFvs mit einer hohen Affinität für das jeweilige Antigen tragen. Immunotubes der Firma Nunc vom Typ Maxisorb mit einem Volumen von fünf ml werden über Nacht mit dem jeweiligen Antigen gecoatet. Dazu löst man die verwendeten Proteine im entsprechenden Puffer. Das inaktivierte Lassavirus befand sich in NTE-Puffer mit 1% NP40, das bakteriell exprimierte rekombinante Lassavirusglykoprotein 2 wurde in Carbonatpuffer aufgenommen und das Plasmodium-falciparum Protein PfF2 wurde in 50mM Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6 in einer Konzentration von 100µg pro ml gelöst. Jeweils ein Milliliter der Antigen-Lösungen wurde in die Immunotubes pipettiert und über Nacht bei 4°C gecoatet. Am darauf folgenden Tag wurden die Immunotubes zweimal mit PBSdef gewaschen und bis zum Rand voll mit 2% MilchpulverPBS gefüllt um freie Bindungsstellen des Immunotube-Kunststoffes abzusättigen. Das Blocken erfolgte über zwei Stunden. 100µl der zu selektionierenden Phagen-Präparation wurde zu 900µl Milchpulver-PBS gegeben und für eine halbe Stunde ebenfalls vorinkubiert, um an das Milcheiweiß bindende Phagen zu entfernen. Nach dem Blocken wurde das Immunotube ausgeschüttet und die Phagen hineingegeben. In den nächsten zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde den Phagen die Möglichkeit gegeben an das Antigen zu binden. Dann wurden die Immunotubes mit PBSdef 0,1% Tween20 und dann PBSdef gewaschen, um nicht haftende oder schwach und unspezifisch haftende Phagen zu entfernen. Diese Wasch-Schritte wurden zwischen fünf und 15 mal durchgeführt, wobei die Anzahl der Waschschrte mit der Anzahl der Selektionsrunden zunahm. Die gebundenen, nicht ausgewaschenen Phagen wurden dann mit einem ml 1mM Triethylamin heftig schüttelnd eluiert und mit 500µl 1M Tris HCl pH7,5 neutralisiert, da die Phagen sonst durch die Triethylaminlösung inaktiviert würden. Um die an das Antigen gebundenen und eluierten Phagen zu vermehren, wurde ein Milliliter davon auf zehn Milliliter TG1 E.coli-Kultur gegeben, die genau wie bei der Methode der Phagentiterbestimmung bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,45 ohne Antibiotikum

gewachsen war. Die Mischung wurde 30 Minuten stehend und nochmals 30 Minuten schüttelnd bei 37°C inkubiert, um den Phagen zur Vermehrung die Möglichkeit zum Eindringen in die Bakterien zu geben. Um die Menge der an das Antigen im Immunotube gebunden Phagen zu bestimmen wurde von dieser Kultur eine Titerreihe von 1:10 bis 1:100000 erstellt. Die restlichen Bakterien wurden dann für zehn Minuten bei 3500rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Milliliter LB-Medium resuspendiert und auf große LB-Ampicillin-Glucoseplatten ausplattiert um die Bakterien bei 30°C über Nacht wachsen zu lassen. Für die Bestimmung der gebundenen Phagenmenge wurden aus der Verdünnungsreihe jeweils 100µl auf kleine LB-Ampicillin-Glucoseplatten ausplattiert. Am nächsten, dem dritten Tag wurden die Bakterien durch Zugabe von 8ml LB-Medium geerntet und drei Glycerolstocks bei -80°C eingefroren. Außerdem wurden 60ml LB-Medium mit Ampicillin und Glucose mit den geernteten Bakterien angeimpft (optische Dichte ca. 0,1) und bis zu einer OD von 0,45 wachsen gelassen, um sie dann mit Helferphagen, in Analogie zum Protokoll der Library-Herstellung zu infizieren. Die Kulturflüssigkeit wurde abzentrifugiert und das Pellet in 50ml LB-Ampicillin-Kanamycin resuspendiert um die Bakterien über Nacht bei 30°C wachsen zu lassen. Am vierten Tag der Immunotubeselektion wurden die Phagen ähnlich zum Protokoll für das Erstellen der Phagenbibliothek geerntet: Die Übernachtskulturflüssigkeit wurde für 15 Minuten bei 3500rpm zentrifugiert um sie von Bakterien zu befreien und dann 1:6 mit PEG-NaCl versetzt um die Phagen zu präzipitieren. Mindestens eine Stunde stellt man dazu diese Mischung auf Eis. Dann wird erneut zentrifugiert, wobei nun das Pellet die präzipitierten Phagen enthält. In einem Milliliter PBSdef aufgenommen werden diese erneut zentrifugiert um sie weiter von Bakterien zu reinigen. Der nun erhaltene Überstand enthält die hergestellten Phagen die in 200µl Portionen bei -80°C eingefroren wurden. Der Titer der entstandenen Phagenlösung wurde nach o.g. Protokoll bestimmt.

#### **4.4.2 Selektion von Antikörper-Phagen mittels Plasmodium falciparum infizierter Erythrozyten**

Um aus der rekombinanten Bibliothek ScFv-Antikörper gegen Oberflächenproteine auf Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten zu selektionieren, musste die Methode der Immunotubeselektion abgeändert werden, da sich die Tubes nicht mit ganzen Erythrozyten beschichten lassen. Anstatt sie mit einem in die Immunotubes gecoateten Antigen zu inkubieren wurde die Phagenbibliothek mit Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten inkubiert. Die Immunoselektion wurde analog der im Punkt D.3.1. beschriebenen Methode

durchgeführt, wobei die Arbeitsschritte mit den Immuntubes durch folgendes ersetzt wurden:

100µl Phagenbibliothek, bzw. in der zweiten und dritten Runde bereits selektionierte Phagen, wurden jeweils über Nacht mit 10µl Spendererythrozyten der Blutgruppe A vorinkubiert, um gegen Blutgruppenantigene auf der Erythrozytenmembran gerichtete Antikörper der Phagenbibliothek abzureichern. Dies wurde in 2%igem MilchpulverPBS durchgeführt. Am nächsten Tag wurde abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Es wurden dann 5µl Plasmodium-falciparum infizierter Erythrozyten dazugegeben und bei Raumtemperatur für zwei Stunden unter leichter Agitation inkubiert. Es folgten Waschschrte, indem die Inkubationsmischung abzentrifugiert wurde und die mit Phagen beladenen Erythrozyten jedes Mal in einem Milliliter PBSdef resuspendiert wurden. Dies geschah je nach Selektionsrunde drei bis sechs Mal. Zentrifugiert wurde bei 2300rpm für 2 Minuten um die empfindlichen Erythrozyten möglichst nicht zu beschädigen. Zwischen den Waschungen wurden die Erythrozyten jeweils in ein neues Eppendorftube überführt, um unspezifisch im Gefäß haftende Phagen nicht in der folgenden Amplifikation zu vermehren. Lysiert wurden die Erythrozyten mit 1mM Triethylaminlösung und damit die gebundenen Phagen freigesetzt. Es wurde weiter wie in Punkt D.3.1 verfahren.

#### ***4.5 Methoden zur Charakterisierung der Phagen-Display- Antikörper-Bibliothek und der selektionierten Phagen***

##### **4.5.1 Kolonie-PCR und BstnI-Restriktionsenzymverdau**

Es wurden wie in Punkt D.1.11. beschrieben Kolonie-PCRs durchgeführt um nachzuweisen, welcher Anteil der Phagemidvektoren vollständige Inserts trägt. Dann wurden die PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym BstnI verdaut, um den Grad der Variabilität der Inserts zu bestimmen. Die Reaktionsmischung wurde wie folgt angesetzt:

10µl Klon PCR-Produkt

0,2µl BSA

4µl NEB2-Puffer

25,5µl Wasser

0,5µl BstNI

Es wurde drei Stunden bei 60°C verdaut. 2µl wurden mit 6xProbenpuffer auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet.

#### 4.5.2 Poly- und monoklonaler Phagen-ELISA

Um zu testen, ob bei der Immunotubeselektion der Phagenbibliothek eine spezifische Anreicherung der gesuchten Phagen stattgefunden hat, wurden poly- und monoklonale Phagen-ELISAs durchgeführt. Die Vertiefungen der Maxisorb ELISA-Platten wurden mit je 100µl der entsprechenden Antigenlösungen über Nacht gecoatet. Die Antigene wurden in folgenden Puffern aufgenommen:

Lassavirus in Zellkulturmedium und 1% NP40

GP2 in Carbonatpuffer

PfF2 in 50mM Phosphatpuffer pH6 in Konzentrationen zu 12,5; 25 und 100µg pro ml

Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen mit 2%MPBS zum Blocken für zwei Stunden aufgefüllt. Dann wurden die Vertiefungen mit 90µl 2%MPBS und 10µl der verschiedenen Phagenlösungen beschickt und für eine Stunde bei Raumtemperatur stengelassen. Dann wurden die Näpfchen sechs Mal mit PBS gewaschen, um dann einen HRP-gekoppelten anti-Phagenantikörper 1:2000 in MPBS verdünnt hineinzugeben. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde erneut sechs Mal mit PBSdef gewaschen und der ELISA durch Zugabe von 100µl ABTS/ Peroxidase Reaktionsmischung gefärbt. Es wurde bei 405 nm in einem ELISA Photometer ausgewertet.

#### 4.5.3 Durchflußzytometrische FACS-Analyse mit verschiedenen Erythrozyten-Präparationen

Das Prinzip der Durchflußzytometrie besteht darin, dass zu messende Partikel, hier Erythrozyten, in einer Kapillaranordnung in Suspension an einer Lichtquelle vorbeifließen und die Lichtabsorption, die Fluoreszenzemission und gestreutes Licht detektiert werden. Als Lichtquelle dient ein Laser. Die Detektoren befinden sich gegenüber und im rechten Winkel zur Lichtquelle. Es können Eigenschaften der durchfließenden Zellen gemessen werden wie die Größe, Form und interne Strukturen. Erythrozyten wurden mit Antikörpern aus Humanseren und mit verschiedenen Phagenpräparationen beladen um spezifische Bindung nachzuweisen. Als Zweitantikörper dienten FITC-markierte anti-human-Antikörper, HRP-gekoppelte anti-Phagen-Antikörper aus der Maus und anti-Maus-FITC-Antikörper. Die Versuche wurden wie folgt durchgeführt:

Für die Inkubation mit Humanseren wurden 2µl der Erythrozyten in 100µl PBS aufgenommen und 1,2 oder 5 µl der Seren dazugegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und leichter Agitation wurden die Zellen zweimal gewaschen, wieder in

100µl PBS aufgenommen und mit 1:200 anti-Human-FITC-Antikörper eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde noch einmal gewaschen und die Zellen in die FACS-Röhrchen überführt. Es wurde eine solche Menge an Zellen in den FACS-Röhrchen dazugegeben, dass sich eine sehr leichte Trübung im FACS-Puffer ergab. Bei der Messung mit dem FACS-Gerät kommt es nicht so sehr auf die Geschwindigkeit der Messung an, da bis zu einer bestimmten Gesamtzahl Zellen gemessen wird. Vielmehr spielt die Konzentration der Zellen in der Trägerlösung eine Rolle: Je niedriger die Konzentration, desto langsamer, aber auch genauer der Zähl- bzw. Messvorgang. Die Waschschrte wurden durchgeführt indem die Zellen in einem Milliliter PBSdef suspendiert und bei 2300rpm abzentrifugiert wurden.

Für die Inkubation mit Phagen wurden 2µl der Erythrozyten und 50µl der „gerescueten“ Phagen zu 2%-igem Milchpulver-PBS gegeben und bei 37°C unter leichter Agitation inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die Erythrozyten in 200µl einer 1:500 Verdünnung des anti-Phagen-Antikörpers (anti-M13) aus der Maus in 2%MPBS für eine halbe Stunde inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und in 200µl einer 1:200 Verdünnung des anti-Maus-FITC-Antikörpers in 2%MPBS resuspendiert.

#### **4.5.4 Lösliche Expression von monoklonalen Single-chain Antikörperfragmenten**

Die scFv konnten direkt aus den Phagenpräparationen hergestellt werden. Dazu wurden ca. 60ml HB2151-Bakterien, die sich in logarithmischer Wachstumsphase befanden mit 40µl monoklonaler Phagenpräparation infiziert und mit IPTG induziert. Nach Wachstum über Nacht bei 30°C wurden Zellpelett und Überstand im Westernblot auf produzierte Antikörper überprüft. Das Wachstum bei 30°C war notwendig, um zu verhindern, dass die gebildeten Proteine in Einschlusskörpern der Bakterien geblieben wären. Es wurde ein anti-his-Tag-Antikörper zur Detektion eingesetzt.

#### **4.5.5 DNA-Sequenzierung der in den Phagemidvektor klonierten scFv-Gene**

Bei der Sequenzierung von DNA kam das ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer zum Einsatz. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Dabei wird eine PCR durchgeführt, in deren Ansatz neben 4 Desoxynukleotiden(dATP, dCTP, dTTP, dGTP) auch fluoreszenmarkierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) vorliegen. Wird bei der Kettenverlängerung ein Didesoxynukleotid eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch, da dem ddNTP die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Der

Einbau der Dideoxynukleotide ist zufällig. Deshalb liegen nach einer genügend großen Anzahl von Zyklen Abbruchfragmente jeder möglichen Nukleotidzahl vor, die dann in einem Polyacrylamidgel der Länge nach aufgetrennt werden. Jedes der Fragmente trägt ein Dideoxynukleotid (ddNTP) am 3'-Ende. Da die vier ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Farben: A grün, C blau, G gelb, T rot), kann während der Elektrophorese über einen Laser ermittelt werden, welches ddNTP sich an der Abbruchstelle befindet. Durch eine spezielle Software wird das so entstandene Fluoreszenzmuster zur Nukleotidsequenz verarbeitet.

Die Reaktionsmischung für die Kettenabbruch-PCR wurde wie folgt angesetzt:

Terminationsmix	4µl
Primer	1µl
zu sequenzierende DNA	1µl
ad 18µl dH <sub>2</sub> O	

diese Mischung wurde im PCR-Cycler folgendem Programm unterzogen:

Denaturierung vor dem 1. Zyklus	95°C	1min.
Denaturierung	95°C	20sec.
Primerbindung	55°C	20sec.
Kettenverlängerung	60°C	4?min.

Abkühlen nach dem letzten Zyklus bei 4°C

Nach der PCR werden die entstandenen Produkte mit Ethanol gefällt. Dabei werden die Fragmente von dNTPs, fluoreszenzmarkierten ddNTPs, Primern, Enzym und Salzen gereinigt und die Konzentration erhöht.

Reaktionsmischung wie folgt:

Ethanol 100%	50µl
3M NaAcetat	2µl
Sequenzier. PCR-Produkt	20µl

Dieser Ansatz wird 30 Minuten bei 14000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 4µl Formamid/EDTA-Puffer aufgenommen.

Zum elektrophoretischen Auftrennen der Fragmente nach ihrer Größe wird ein 5%-iges Acrylamidgel verwendet, dessen Porengröße so gering ist, dass auch noch kleine Fragmente sich von einander trennen können.

Die Gelelektrophoresekammern des Sequenziergerätes werden folgendermaßen vorbereitet und dann aufgebaut:

Die Glasplatten werden gründlich mit Detergens und Wasser gereinigt und gespült, mit Propanol zum Trocknen besprüht und noch anhaftende Staubteilchen vorsichtig entfernt. Dann werden die Glasplatten der Kammer eingebaut. Das Gel wird nach untenstehendem Reaktionsansatz vorbereitet und nach Zugabe von 20µl TEMED und 300µl APS zum Starten der Polymerisation so rasch wie möglich zwischen die zwei horizontal stehenden Platten gegossen. Es sollten sich im Gel keine Luftblasen befinden, da dies die Elektrophorese in der betroffenen Spur stören würde. Zum Beladen des Gels mit den Sequenzierproben werden mit einem Kamm an einer Längsseite Taschen geformt. Vor dem Auftragen werden die Proben für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Es werden Pro Kammer je 2µl aufgetragen.

Das Gel wird folgendermaßen bereitet:

Ansatz für 5% Acrylamid/ 7M Harnstoff Gel

Harnstoff	21µl
30% Acrylamidlösung	8,4ml
10x TBE	6ml
dH <sub>2</sub> O	20ml

Diese Mischung wird für 15 Minuten gerührt und dann filtriert um Luftblasen und nicht gelöste Partikel zu entfernen.

#### 4.5.6 Datenbank-Recherche und BlastP-Analyse der Proteinsequenzen

Nach erfolgreicher Sequenzierung der Klon-PCR-Produkte aus dem Phagenscreening, wurden die Proteinsequenzen der Schwerketten translatiert und einer Datenbankrecherche ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) unterzogen. Desweiteren wurden die Proteinsequenzen mittels BlastP (Altschul S.F. et al., *Nucleic Acids Res.* 1997) auf ihre Übereinstimmung mit vorhandenen Proteinsequenzen in der Datenbank verglichen.

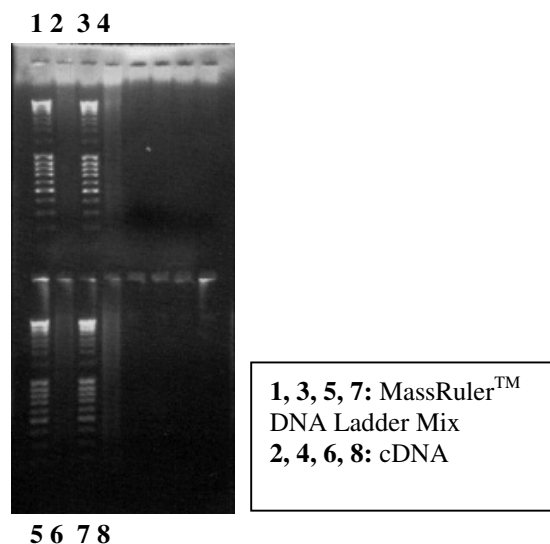


## 5 Ergebnisse

### 5.1 Konstruktion der rekombinanten Phage-Display-Antikörper Bibliothek

#### 5.1.1 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Die mRNA wurde nach der im Methodenteil dieser Arbeit beschriebenen Verfahrensweise aus den gradientengereinigten Lymphozyten extrahiert. Die Konzentration der RNA wurde nicht bestimmt, da man möglichst wenig Materialverluste haben wollte und jedes weitere Handling mit RNA die Gefahr der Kontamination mit RNAsen bringt, was diese sehr wertvolle Ressource unserer möglichst diversen Library vermindert hätte. Desweiteren wurde der Erfolg der mRNA-Extraktion, wie auch der cDNA Synthese durch die folgende PCR und den Nachweis der Amplifikate auf Agarosegelen gezeigt.



**Abb. 5.1:** cDNA auf 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, es sind aufgrund der geringen Menge an cDNA, welche bei reverser Transkription entsteht, keine distinkten Banden zu sehen.

#### 5.1.2 PCR-Amplifikation der kappa V-Gene, der lambda V-Gene und der Schwerketten V-Gene

Die Polymerasekettenreaktion wurde nach Protokoll durchgeführt. Nur nach der zweiten Amplifikation mittels nested-PCR ließen sich die erwarteten Amplifikatprodukte nachweisen, was auf die geringe Menge an cDNA aus der mRNA der Lymphozyten hinweist. Es wurden PCR-Reaktionen mit und ohne der im Qiagen Taq-PCR-Core-Kit mitgelieferten Q-Lösung durchgeführt und die Schärfe der Banden und die Ausbeute an Amplifikaten verglichen. Obwohl auch ohne Q-Lösung PCR-Produkte zu detektieren waren entschied man sich diese

dann für alle weiteren PCR-Amplifizierungsschritte zu verwenden. Ohne Q-Lösung gab es mit einigen Primerkombinationen keine Amplifikate, zu sehen in Abbildung 5.2. Korrespondierend zum Materialabschnitt und dem Methodenabschnitt dieser Arbeit wurden die einzelnen Reaktionen folgendermaßen bezeichnet:

- Amplifikation der kappa V-Gene:

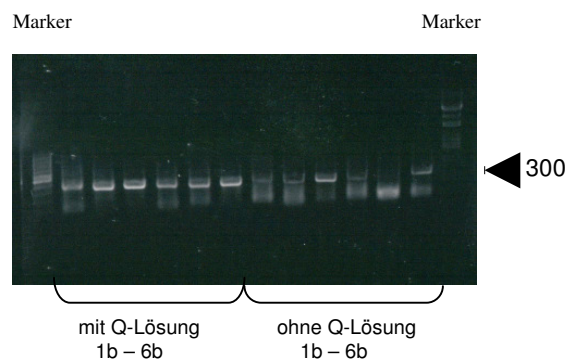
Reaktionen 1a-6a und „nested“-PCR 1b-6b

- Amplifikation der lambda V-Gene:

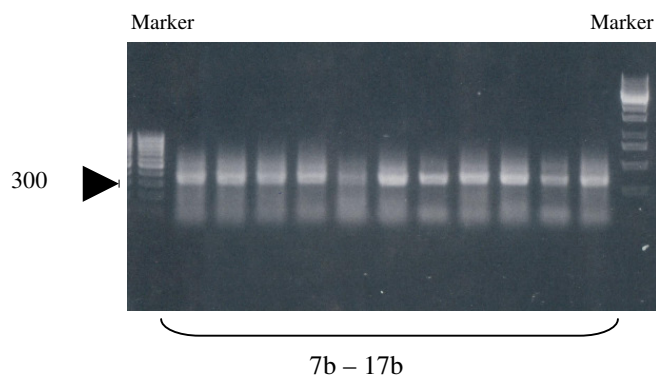
Reaktionen 7a-17a und „nested“-PCR 7b-17b

- Amplifikation der Schwerketten-V-Gene:

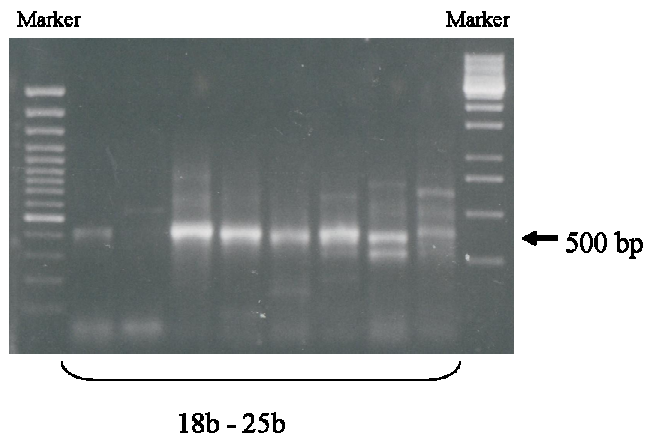
Reaktionen 18a-25a und „nested“-PCR 18b-25b



**Abb. 5.2:** Vergleich der Amplifikate der kappa V-Gene ohne und mit Q-Lösung



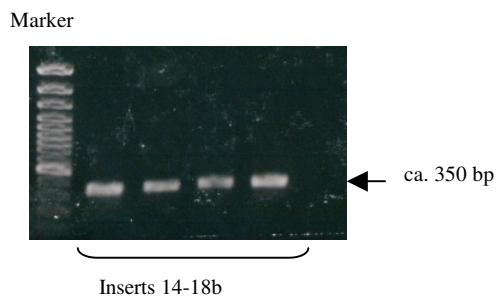
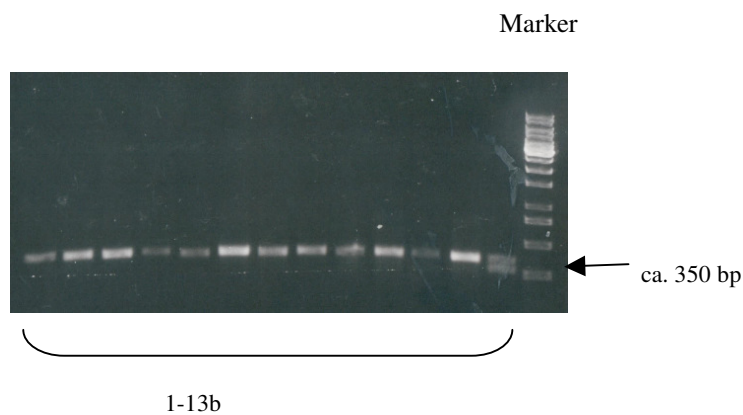
**Abb. 5.3:** PCR der Amplifikate lambda V-Gene



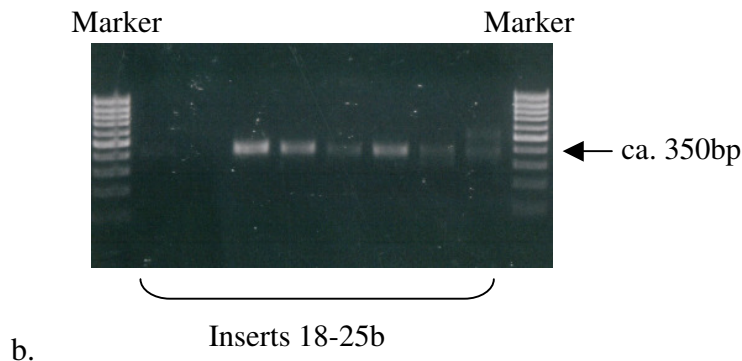
**Abb. 5.4:** PCR Amplifikate der Schwerketten V-Gene

### 5.1.3 Ergebnisse der Verdau der PCR Amplifikate und deren Aufreinigungsmethoden

Die Gelextraktionen, Verdau und Aufreinigungsschritte wurden mit größter Sorgfalt durchgeführt um möglichst wenig DNA der variablen Antikörperregionen-Gene der Bibliothek zu verlieren. Aliquots der klonierungsbereiten Inserts wurden auf 1,5%-ige Agarosegele aufgetragen:



a.

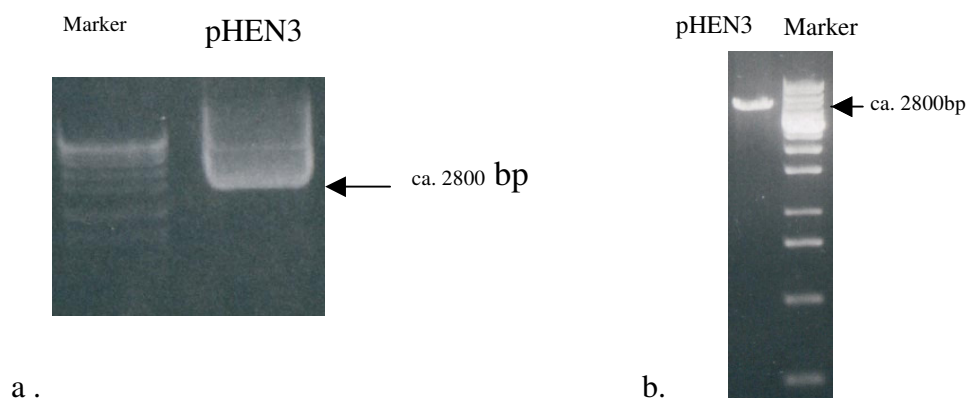


b.

**Abb. 5.5:** Klonierungsbereite Inserts der Variablenkettengene V-kappa, V-lambda (a) (Spuren 1-17) und Schwerketten-V-Gene (b).

#### 5.1.4 Ergebnisse der Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3 und dessen Restriktionsverdau und Aufreinigung

Nach der Maxipräparation des Phagemidvektors pHEN3, dessen Restriktionsverdau und dessen Behandlung mit Shrimp-Alkaline-Phosphatase wurden von jedem Arbeitsschritt Alliquots auf Agarosegelen aufgetrennt und unter UV-Licht betrachtet bzw. photographiert:



**Abb. 5.6:** Vektor pHEN3 nach Maxipräparation (a.) und nach Behandlung mit Shrimp-alkaline-Phosphatase (b.)

Die DNA-Konzentrationen der pHEN3 Maxipräparationen betrugen bei mehreren Herstellungsansätzen zwischen 0,236 µg/µl und 0,642 µg/µl.

#### 5.1.5 Ergebnisse der Klonierung der variablen Leicht- und Schwerketten-Gene der Antikörper in den Phagemidvektor pHEN3

Wie im Methodenteil beschrieben wurden zuerst die variablen Leichtketten-Gene kappa und lambda in den Phagemidvektor pHEN3 kloniert. Die zur Bestimmung der Klonierungseffizienz durchgeführte Titerreihe, in der 10 µl der elektroporierten TG1-

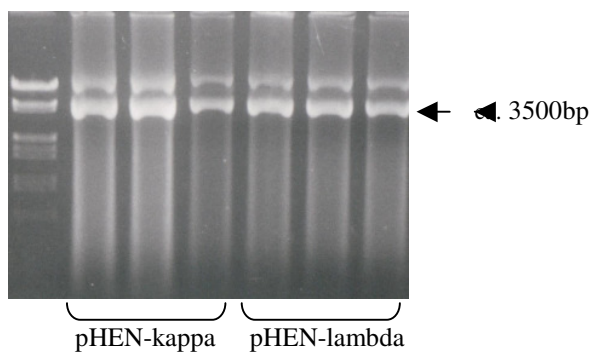
Bakterien in Zehnerschritten verdünnt und über Nacht bei 37°C auf kleinen Agaroseplatten inkubiert wurden, zeigten auf der Platte mit der  $10^{-4}$  Verdünnung 14 Kolonien für den Kappa-Ansatz und 20 Kolonien für den Lambda-Ansatz. Daraus ergibt sich eine Klonanzahl von jeweils ca. 3 Millionen für kappa und lambda.

Die Maxipräparation der geernteten Bakterien ergab folgende Ausbeuten an DNA:

Kappa :	1.:	0,585 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
	2.:	0,4275 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
	3.	0,2325 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Lambda :	1.	0,3525 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
	2.	0,3225 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
	3.	0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Die maxipräparierte DNA wurde auf Agarosegel aufgetragen :

Marker

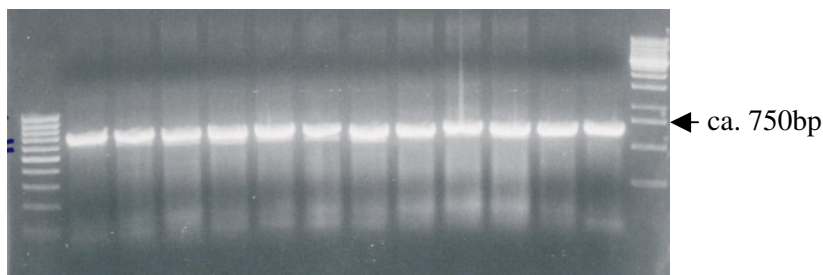


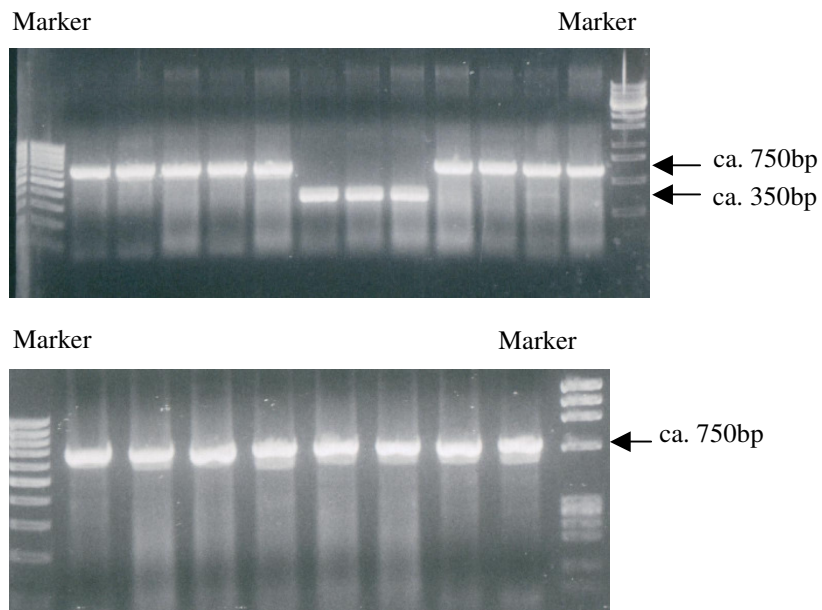
**Abb. 5.7:** Maxipräparations-DNA pHEN3-kappa und pHEN3-lambda

Das Koloniescreening von 30 Kolonien ergab eine Klonierungseffizienz von 30-90%, es wurden zwei Ligationen durchgeführt:

Marker

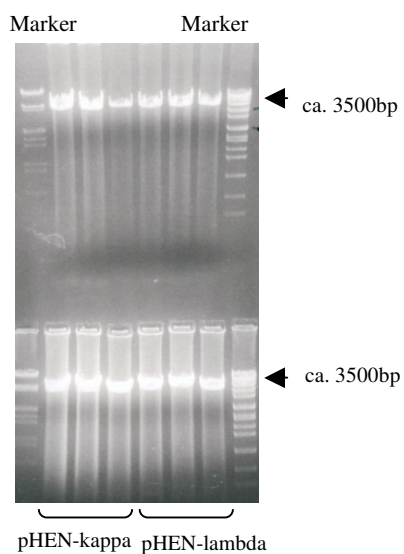
Marker





**Abb. 5.8:** Koloniescreening pHEN3-kappa (Klone 1-14) und pHEN3-lambda (Klone 15-32)

Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen SfiI und Xho wurden erneut Aliquots der DNA auf Agarosegele aufgetragen und sichtbar gemacht:



**Abb. 5.9:** Verdaute Vektoren pHEN3-kappa und pHEN3-lambda

### 5.1.6 Ergebnisse der Klonierung der variablen Regionen der Schwerketten-Gene in die geschnittenen Vektoren pHEN3-kappa und pHEN3-lambda

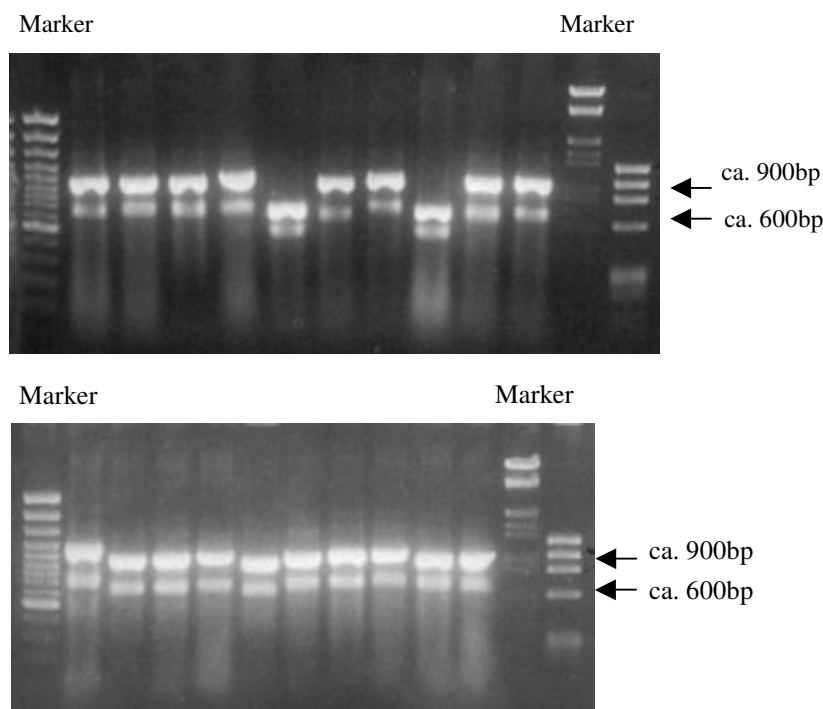
Die Klonierung wurde wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben durchgeführt und die elektrokompenten TG1-Bakterien mittels Elektroporation transformiert um eine hohe Effizienz zu erhalten. Es wurden wieder Titerreihen zur Bestimmung der transformierten Klonanzahl angefertigt und diese ausgezählt.

Dabei ergaben sich folgende Koloniezahlen:

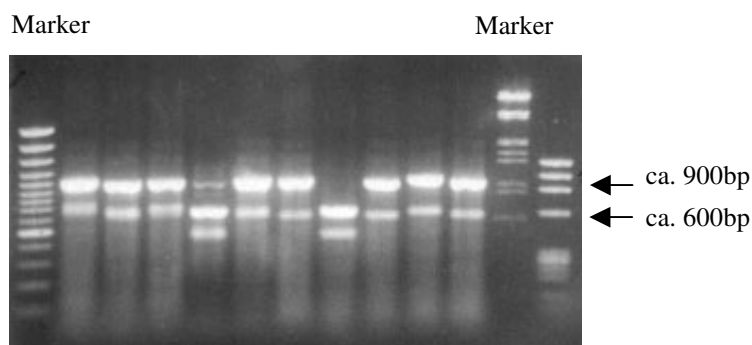
Kappa:  $10^5$ -Platte: 40 Klone=> 4 Millionen Klone transformiert

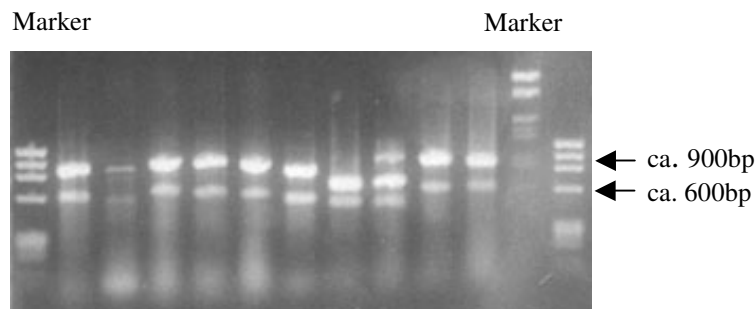
Lambda:  $10^5$ -Platte: 30 Klone=> 3 Millionen Klone transformiert

Zur Überprüfung der Klonierungseffizienz wurden auch hier Kolonie-PCRs durchgeführt um zu prüfen, welcher Prozentsatz der Phagemidgenome beide Inserts erfolgreich inkorporiert hatte. Die Klonierungseffizienz nahm ab und betrug bis zu 75%:



**Abb. 5.10:** Koloniescreening pHEN3-kappa-heavy-chain





**Abb. 5.11:** Koloniescreening pHEN3-lambda-heavy-chain

### 5.1.7 Titerbestimmung der Phage-Display-Antikörper-Bibliothek

Wie im Methodenteil beschrieben wurde die Menge an Phagen, der Titer in der fertigen Phagenlösung bestimmt.

Es ergaben sich folgende Koloniezahlen:

Kappa : 160-2000 Kolonien, was einen Phagentiter von  $160-2000 \times 10^{12}$  Phagen in 10µl ergibt

Lambda : 400-1600 Kolonien, was einen Phagentiter von  $400-1600 \times 10^{12}$  Phagen in 10µl ergibt

### 5.1.8 Sequenzierung einer Zufallsstichprobe von 14 Klonen der Bibliothek und Vergleich der Proteinsequenzen untereinander

Es wurden 14 Sequenzierungen von zufällig ausgewählten Klonen durchgeführt um orientierend die Diversität der Library zu überprüfen. Als Sequenzierprimer wurde der Primer LMB3 wie für das Koloniescreening verwendet. Die Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm CloneManager translatiert und die erhaltenen Aminosäuresequenzen mittels ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) verglichen. Im Folgenden sind die Sequenzen von VH-Inserts, da diese überwiegend für die Antigenspezifität des Antikörpers verantwortlich sind, aufgelistet.

- LMB3: Die hervorgehobenen Aminosäuresequenzen stellen das Insert II (Schwerketten-Amplifikate VH) dar:

		<b>FR1</b>	
2D	--SAEAPCFFYFET-VIMKYLLPTA-AGLLLLAQPAMA	QVQLQQWGAGLLKPSET-LSLT	55
6C	-FLLLKACIFYFET-VIMKYLLPTAFAGLLLLAQPAMA	QVQLQQWGAGLLKPSET-LSLT	57
10B	--SPLNAC-FYFET-VIMKYLLPTA-AGLLLLAQPAMA	QVQLQESGPGLLKPSET-LFLT	54
23D	-SHLKLACKFYFKETVIMKYLLPTA-AGLLLLAQPAMA	QVQLQESGPVLMKPSET-LSLT	57
1C	---RSLACFYFKETVIMKYLLPTAAGLLLLAGQPAMA	QVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	55
3C	---FPPPEARMLLFETVIMKYLLPTAAGLLLLA-QPAMA	EVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	56
9B	---SSSSAHFSISRQSNTRYCLR-FAGLLLLAGQPAMA	EVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	55
26C	---SSISSHASISRQSNTRYCLRQFAGLLLLA-QPAMA	EVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	55
7D	----GSTPAFLFPETVIMKYLLPTAAGLLLLA-QPAMA	EVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	54
17D	---LSLTPAFLF-ETVIMKYLLPTAAGLLLLAGQPAMA	EVQLVETGGGLVQPGES-LRLS	55
25B	FEVHKLACKFYFKETVIMKYLLPTAAAGLLLLAQPAMA	EVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	59
4D	GFNPLKACIFYFKETVIMKYLLPTAVAGLLLLAQPAMA	EVQLVESGGGLVQPGES-LRLS	59
21B	---LSLKACFYFKETVIMKYLLPTAAGLLLLAGQPAMA	QVQLQESGGRLGTAWGPETLL	57
22C	-FVHKLACKFYFKETVIMKYLLPTAAAGLLLLAQPAMA	QVQLQESGGRRGPAWEVPETLL	59
	:	. * * . * * * * * : * * : *	



	CDR1	FR2	CDR2	FR3	
2D	CAVYGGSF--SGFYWSWIRQPPGKGLEWIGE	INHSGT-IKYNPSLKSRVTISIDTSKNQF			112
6C	CVVTGGST--SGYYWNWIRQSPGKGLEWIGE	ISHSGK-TYYPSSLKSRVSIIDTSKNQF			114
10B	CTISGDSLKDSPFYWGWIRQSPRKGLEWIGSV	HYNGN-SYDNPSLRSRVTMSTDSSKNQF			113
23D	CTVSGGSI--SSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYI	YSTGS-SLYSPSLKSRVTISVDTSKNQF			114
1C	CAAPGFTF--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	QDGSEKFYVDSVKGRFTISRDNAKNSL			113
3C	CAASGFTF--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	QDGSEKFYVDSVKGRFTISRDNAKNSL			114
9B	CAASGFTF--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	EDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNVKNLSL			113
26C	CAASGDFD--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	QDGSEKFYVDSVKGRFTISRDNAKNSL			113
7D	CAASGFTF--SSYWMSWVRQTPGKGLEWVANIK	QDGSEKFYVDSVKGRFTISRDNAKNSL			112
17D	CAASGFTF--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	QDGSEKFYVDSVKGRFTIFRDNAK-TH			112
25B	CAASGFTF--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	QDGSEKFYVDSVKGRFTISRDNAKNSL			117
4D	CAASGFTF--SSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIK	QDGSEKCYGLCEGPIHHLQRQRELTV			117
21B	CSLWIHLQLWHELGPFGSREGAGVGLNYWSWC	-----HILRRLREGPVHHLQRQFQEH			111
22C	CSLWIHLQLCHALGPPGSRQAGVGGSSYSW	-----QIPRRLREGPIHHLQRQFQEH			112
	*	*: . * .:		:	
2D	SLEVELLPRT--LCITVREAASIFLS-----	GYWEF--VLLLLLGRTMF----	KW-W		156
6C	SLKLHSVTAAD-TAVYYCAPEAVYSSTLDYLGP	GEPWSPSRVVEAVQAEGGFGGKTKWGW			173
10B	FLRLNSVTAAD-AGRLLEKMSGAGP-----	KFTTWPGQGTPKGPGPVFGGK-KG--			162
23D	SLSLTSCVRLRTRPVYYCAKGPKELSVN----	TALTFWAPLPVVEAQAEVLLP----	EAHL		167
1C	VSCKTALRTEDTAWYYCARRSSRTNF-----	WSGLNPRRFLGRLGAKDTGTR----	FSG		163
3C	YLQMNSLRAEDTAVYYCARRSRTIF-----	WSGPHPPALHGRLGAKEPWHRLVEPFKP			168
9B	GLQMNSQKAP---TRLCTIRK-----	ERP-----WG-----GLTP---	LWAP--		144
26C	YLQMNSLRAEDTAVYYCARRSKSYDF-----	LEWPPPVATWTSGAQGTTTLEWWRPKP			167
7D	YLQMNSLRARGG---VFAKIGS-----	PPFMDWGKAPWHLGGGGG-----			149
17D	CICKTSLRAEDT---LITRERVRPI-----	LEAPLMDADHGPRFRGGGFG-----			154
25B	YLQMNLRAEDTGCVLLVPEDRVVR-----	IFGVGLTPVHGPGPKEHRPLQWWSRSSR			170
4D	SANEQP-ESRGHGCVLLCEKSESYQF-----	LEWSPPSLHGPGSGGQAPWQP----	LEW		166
21B	VSANEQPESRGHGRVLLCDLLCFHLL-----	YHPPRPTTGPGLA-----			152
22C	VSSNEQPES--HRCVLLCQCGSKVMN-----	TTWGV PQYWGGLVPMGGAQA-----			158
2D	RRLSRGGFACPGKTKQPLFPGEK----				179
6C	IVSSPPWFFFQGES--PLLARKGV----				195
10B	-GKPPFFFSFGK--PPFLGGG----				182
23D	IYLSPWGGSFRKRP----FPG-----				184
1C	SRLSRGFCRPKLYSLFVPRPP-----				184
3C	KWLLPEVHMVDPTSLFLGFPLKKL----				192
9B	---FGGSVFG-KKPFFFKPPF-----				161
26C	KWLWRCTSLGPSSDFLGSPO-----				188
7D	--VFG--KKGVP TPLFF--GKPP--				167
17D	--GLGGPKIGFPFPFFFPQKKP---				176
25B	SGFCRNAQLGLTKPSFFFLGKPN----				193
4D	GGLSRSGGPPWVDSGLFCFPDKP----				189
21B	---GGRGFKGPP---GP-----				164
22C	-GAFAGPNFGLIKPPCFGAPRGKRLPP				184

Es findet sich die grösste Diversität in den hypervariablen Regionen, besonders in der CDR2.

### 5.1.9 Vergleich der Sequenzen aller Klone mit der Gen-Bank

Die translatierten Insert-VH-Proteinsequenzen wurden mittels BlastP Datenbank-Suche auf ihre Übereinstimmung mit bekannten Proteinsequenzen untersucht. Hierzu wurde die Datenbank unter der Internetadresse: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) verwendet, und die Sequenzen mittels Blast P, wie in 3.4.6 Material und Methoden beschrieben, analysiert.

Die Datenbankanalyse bestätigte, dass es sich bei allen Insert VH-Proteinsequenzen um jeweils Schwerketten von Immunglobulinen handelt. Die Sequenzübereinstimmungen

befanden sich jeweils in den variablen Regionen der Datenbank-Immunglobuline. Im Folgenden werden nur die Übereinstimmungen mit dem jeweils höchsten Grad als Beispiele wiedergegeben.

- Alignement für Inserts VH-Schwerketten:

- 4D

```

☐ >gi|42541058|gb|AAS19426.1| anti-SARS S protein immunoglobulin heavy chain
variable region
[Homo sapiens]
Length = 124

Score = 117 bits (292), Expect = 2e-25
Identities = 55/59 (93%), Positives = 57/59 (96%)

Query: 39 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY 97
      +VQLV+SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS WMSWVRQAPGKGLEWVA IKQDGSEKY
Sbjct: 1 QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSWMSWVRQAPGKGLEWVAYIKQDGSEKY 59
  
```

- 9B

```

☐ >gi|15637437|gb|AAL04526.1| anti-pneumococcal capsular polysaccharide
immunoglobulin heavy
chain variable region [Homo sapiens]
Length = 98

Score = 112 bits (280), Expect = 5e-24
Identities = 52/59 (88%), Positives = 56/59 (94%)

Query: 39 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY 97
      EVQLVESGG LVQPGG LRLSCAASGFTFS+ WMSWVRQAPG+GLEWVA+IK+DGSEKY
Sbjct: 1 EVQLVESGGALVQPGGPLRLSCAASGFTFSASWMSWVRQAPQGLEWVADIKEDGSEKY 59
  
```

## ***5.2 Testung der unselektionierten Phage-Display-Antikörper-Bibliothek und verschiedener polyklonaler Seren mit den für die Selektion verwendeten Antigenen***

Es wurden ELISA, Immunfluoreszenz, Western-Blot- und FACS-Analysen mit der unselektionierten Phagenlibrary und den Antigenen durchgeführt, welche später für die Phagenselektion verwendet wurden, (Lassavirus, Lassavirus-GP), das Malariaprotein PfF2 und mit Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten). Bei dem P. falciparum Stamm Bandia handelte es sich um ein Isolat aus dem Senegal und der Stamm PebER stammte aus Südamerika.

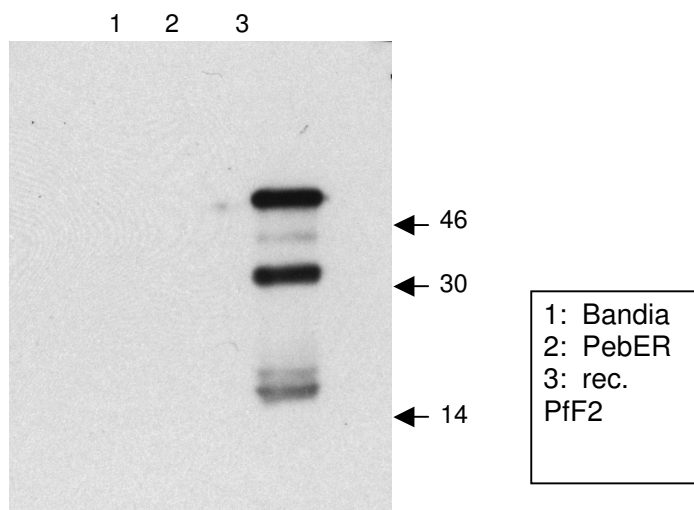
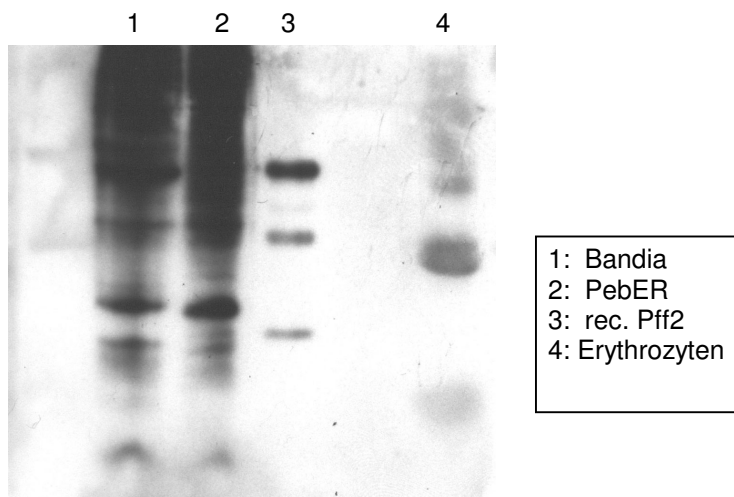
Aus Abb.5.12 ist ersichtlich, dass polyklonales Mausserum gegen PfF2 die stärkste Bindung aufweist. Das Serum des Lymphozytenspenders zeigte eine doppelt so starke reproduzierbare

Bindung an beide rekombinanten Antigene (GP2 und PfF2). Das Serum der Kontroll-Maus zeigte weitgehend Bindung an beide Antigene. Nur das Serum des Lymphozytenspenders, reagierte mit dem rekombinanten Lassavirusprotein GP2.

	PfF2 25µg/µl	PfF2 12,5µg/µl	Lassa-gp2	Puffer	PfF2 25µg/µl	PfF2 12,5µg/µl	Lassagp2	Puffer
Maus- anti- PfF2 1:800	*****	2,625	0,054	0,077	2,701	0,483	0,070	0,069
Sponder 1:500	0,264	0,201	0,191	0,117	0,207	0,096	0,223	0,146
Maus- normal 1:400	0,057	0,100	0,067	0,050	*****	0,088	0,063	0,048

**Abb. 5.12:** Serum-ELISA: Seren gegen PFF2 und GP2 (Doppelansatz): das anti-PfF2 Serum von der Maus bindet ausschliesslich an PfF2, das Serum des Lymphozytenspenders zeigt Bindung an PfF2 und Lassavirus-GP2.

Es wurde eine Westernblot-Analyse der verwendeten Malariaantigene durchgeführt (Abb 5.13). In a. erkennt man, dass das gegen PfF2 immunisierte Mausserum nur mit dem rekombinanten PfF2 reagierte und es scheint sich auch kein kreuzreagierendes PfF2-Epitop in den verwendeten Plasmodien-Präparationen zu finden. In b hingegen wurde der Blot mit humanen gepoolten Sponderseren (der drei Lymphozytenspender der zusätzlich freundlicherweise von Herrn Dr. rer.nat. S. Daffis zur Verfügung gestellten antibody-Phage-display-Libraries) inkubiert. Hier sah man ebenfalls eine Reaktion mit dem rekombinanten PfF2, sowie Reaktionen mit verschiedenen (nicht näher charakterisierten) Antigenen der Plasmodien-infizierten Erythrozyten.

**a.****b.**

**Abb. 5.13:** Westernblotanalyse von Seren gegen PFF2 und infizierte Erythrozyten

**a.** Inkubation mit polyklonalem anti-Pff2-Serum aus der Maus.

**b.** Inkubation mit gepoolten humanen Seren der Lymphozytenspenders.

Es wurde dann im ELISA untersucht, ob die unselektionierte Phage-display-Antikörper-Bibliothek des Lassa-immunen Lymphozytenspenders Lassa-spezifische Phagen enthält. Es konnte gezeigt werden, dass dies wenn auch in wahrscheinlich niedrigen Titern, der Fall war. Im Gegensatz zu den Negativ-Kontrollen (BSA, Zellkultur-Überstand und TG1-Bakterien-Kulturüberstand) zeigte sich ein zwei- bis viermal stärkeres Signal (Abb 5.14).

	Lassavirus	Lassavirus	BSA 100µg/ml	BSA 100µg/ml	nicht inf. Vero- Zellkultur- ÜS	nicht inf. Vero- Zellkultur- ÜS
unselektionierte Phagenlibrary	0,344	0,252	0,075	0,077	0,085	0,102
unselektionierte Phagenlibrary	0,333	0,240	0,310 Phosphat- puffer	0,100 Phosphat- puffer	0,070 TG1-Kultur- ÜS	0,155 TG1- Kultur-ÜS

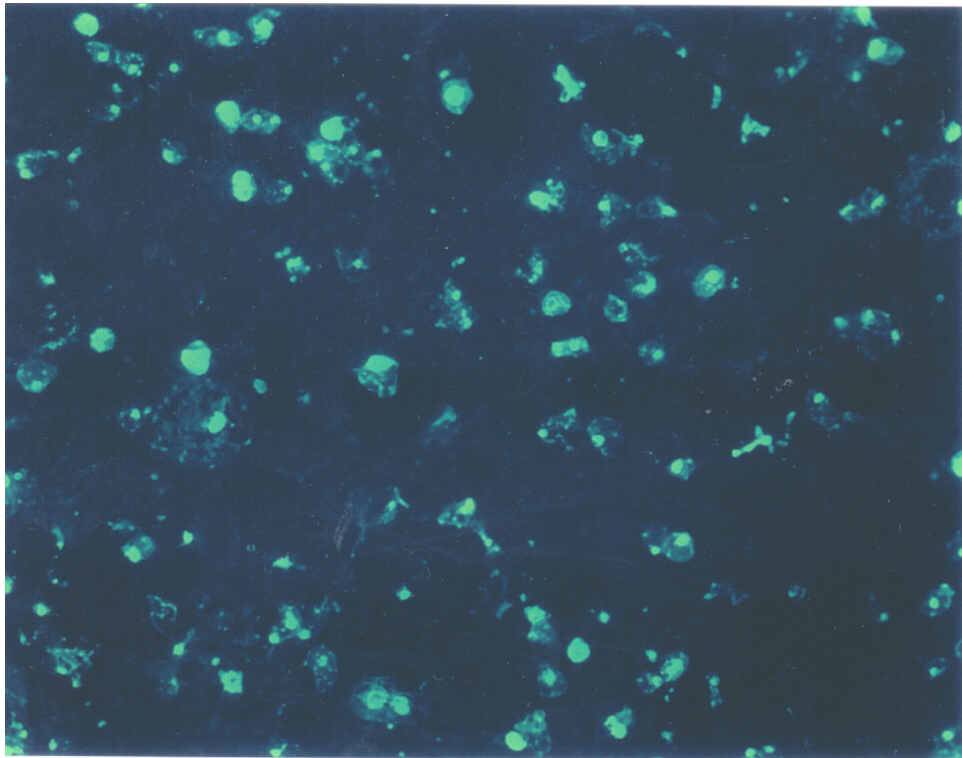
**Abb. 5.14:** Polyklonaler Phagen-ELISA (Doppelansatz): Reaktivität der Antikörperphagenlibrary mit gamma-bestrahltem Lassavirus: es ist eine dreimal stärkere Bindung der Phagenbibliothek an Lassavirus im Gegensatz zu den Negativkontrollen zu sehen.

Das gleiche ELISA-Experiment wurde für die unselektionierte Phage-display-Antikörper-Bibliothek und das rekombinante PfF2 durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein spezifisches Signal als Zeichen für spezifische Bindung von Phagen aus der Library (Abb. 5.15).

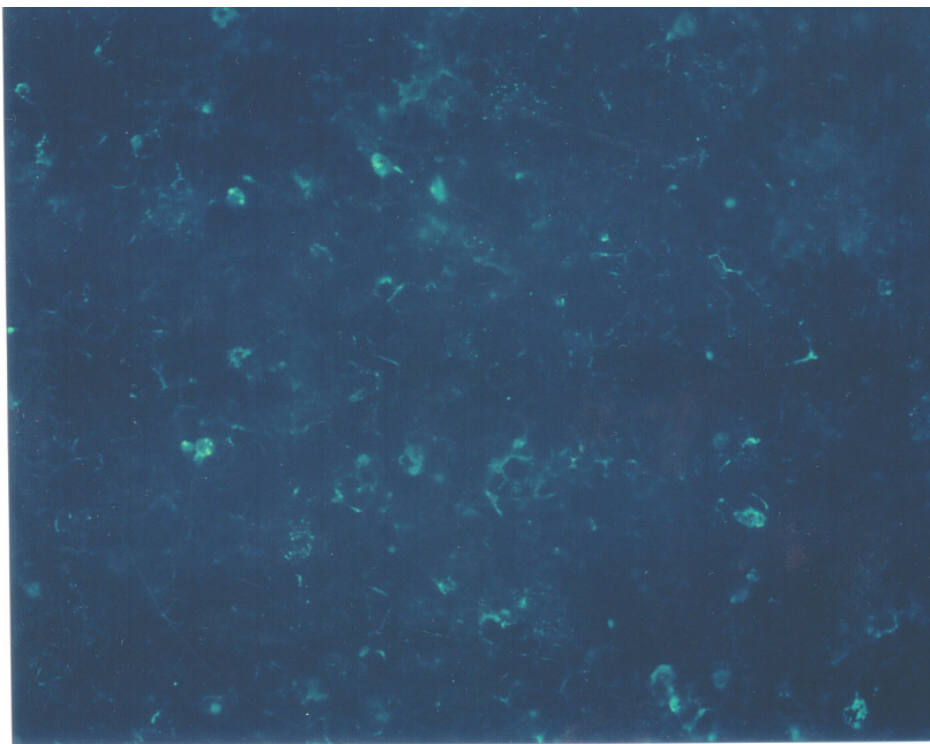
	PfF2 12,5 µg/ml	PfF2 12,5 µg/ml	BSA	BSA
unselektionierte Phagenlibrary	0,661	0,504	0,065	0,059
PBS	0,057	0,054	0,060	0,057

**Abb. 5.15:** Polyklonaler Phagen-ELISA (Doppelansatz): die Phagen in der unselektionierten Antikörperphagenlibrary binden spezifisch an PfF2

Der Nachweis von Antikörpern gegen Proteine, welche auf mit Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten exprimiert werden, wurde mit der Immunfluoreszenz und der Durchflußzytometrie durchgeführt. Bei der Durchflußzytometrie zeigte sich, dass mit Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten vom Serum des Spenders aus Westafrika lysiert werden. Dies wurde auf das Vorhandensein von Komplement im Serum zurückgeführt, welches deshalb für eine Stunde auf 56°C erhitzt wurde. Es fand danach keine Lyse mehr statt. Wie in der Abb.5.16 zu sehen ist binden Antikörper des Lymphozytenspenders spezifisch an Malaria-infizierte Erythrozyten.



a.

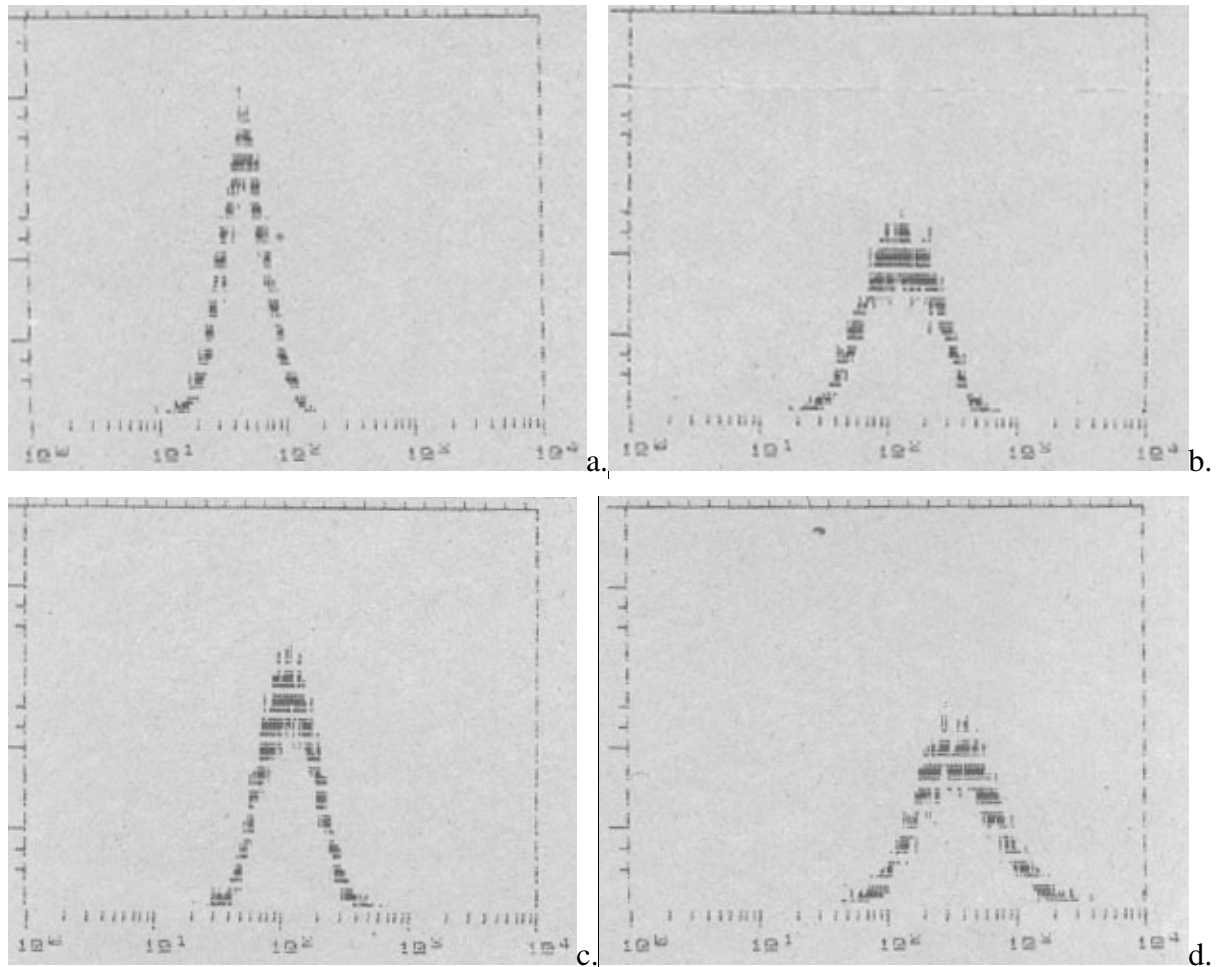


b.

**Abb. 5.16.:** Immunfluoreszens Spenderserum auf *P. falciparum*-infizierte(a.) und nicht-infizierte Erythrozyten(b.): angefärbte Erythrozyten sind in a. erkennbar

Die FACS-Analysen aus Abb.5.17 zeigen, dass die Reaktion von Humanseren mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten spezifisch ist: mit afrikanischem Spenderserum inkubierte

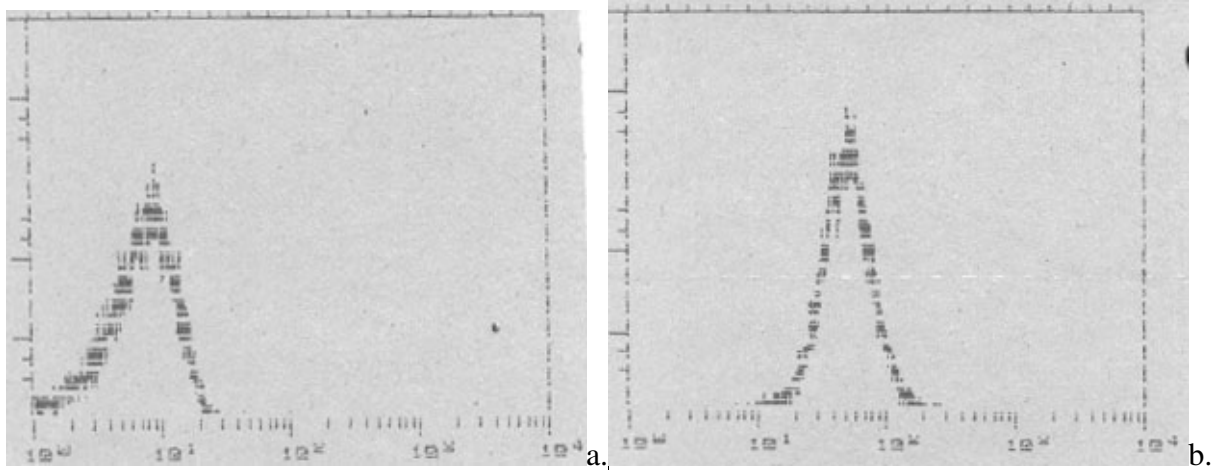
infizierte Erythrozyten fluoreszieren insgesamt ca. 10mal stärker als Inkubationen mit europäischen Seren und nicht-infizierten Erythrozyten.



**Abb. 5.17:** FACS-Analyse von Humanseren auf verschiedenen Erythrozyten-Präparationen (die X-Achse gibt die Fluoreszenz-Intensität und die Y-Achse die Zell-Zahl an):

- a. normale Erythrozyten mit einem europäischen Spenderserum inkubiert
- b. normale Erythrozyten mit dem afrikanischen Patientenserum inkubiert( Lymphozytenspender für die Phagenbibliothek)
- c. Malariainfizierte Erythrozyten, welche Knobs ausbilden wie in Punkt a. inkubiert
- d. Erythrozyten wie in c. mit Serum wie in b. inkubiert

Mit der fertigen Phagenbibliothek wurden danach auch FACS-Analysen durchgeführt, und es zeigte sich, wie in Abb.5.18 ersichtlich, dass die unselektionierten Phagen etwa zehnmal stärker an die infizierten Erythrozyten binden, als an nicht-infizierte Erythrozyten.



**Abb. 5.18:** FACS-Analyse Phagenlibrary gegen verschiedene Erythrozyten-Präparationen:

- a. normale Erythrozyten mit unselektionierter Phagenlibrary inkubiert
- b. Malariainfizierte Erythrozyten, welche Knobs ausbilden wie in Punkt a. inkubiert

### ***5.3 Ergebnisse der Immunselektionen der Phage-Display-Antikörper-Bibliothek mit verschiedenen Antigenen***

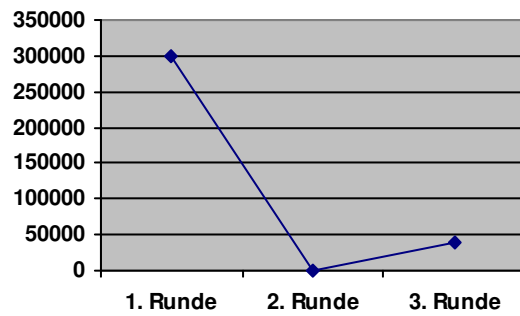
Es wurden die Anzahl der eluierten Phagen aus den einzelnen Selektionsrunden der Immunotube und Erythrozyten-Selektionen mittels Titerreihen bestimmt um festzustellen ob eine Anreicherung von spezifischen Phagen stattgefunden hatte. Am Schluss der Selektionen wurden polyklonale Phagen-ELISA-Essays mit den verwendeten Antigenen durchgeführt um zu zeigen, dass sich Antikörper spezifisch für das verwendete Antigen anreichern ließen oder nicht. Es wurden von den jeweils letzten Selektionsrunden Koloniescreening-PCRs durchgeführt um festzustellen welcher Anteil der selektionierten Phagen intakte VH-VL-Inserts trägt. Danach wurden mit dem Restriktionsenzym BStnI Fingerprinting-Verdaus angesetzt um einen Hinweis auf die Diversität der nach mehreren Selektionsrunden angereicherten Phagen zu bekommen.

#### **5.3.1 Selektion der Bibliothek mit NP 40 inaktiviertem Lassavirus**

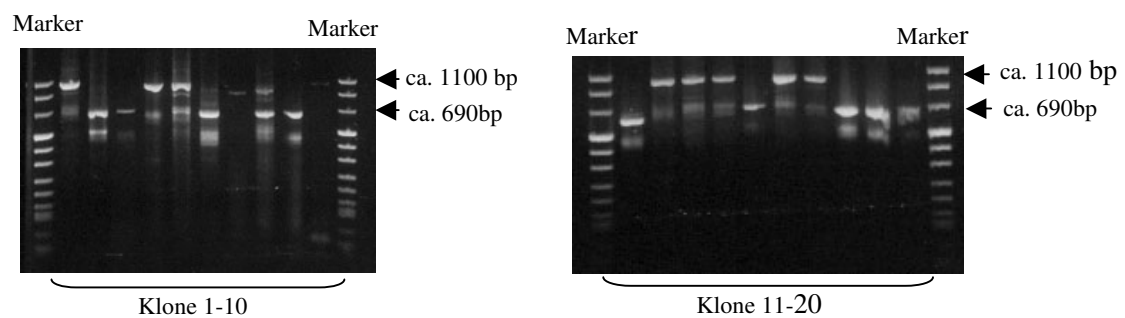
Verlauf der Anzahl eluierter Phagen: Selektion auf Lassavirus

1. Selektionsrunde: ca. 300000 Phagen
2. Selektionsrunde: ca. 1040 Phagen
3. Selektionsrunde: ca. 40000 Phagen

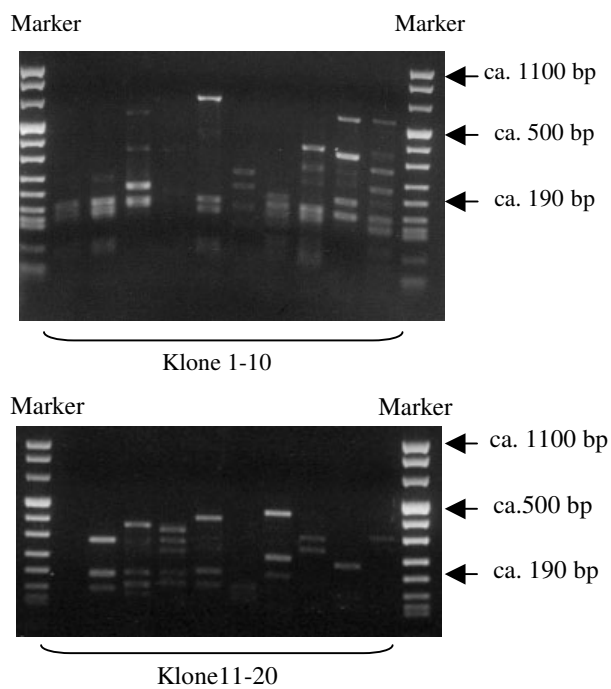




**Abb. 5.19:** Phagenanzahlverlauf der eluierten Phagen (Antigen Lassavirus)



**Abb. 5.20:** Koloniescreening mittels PCR der dritten Selektionsrunde (Antigen Lassavirus) ( 20 Klone)



**Abb. 5.21:** BstNI-Fingerprinting der 20 Klone aus der Kolonie-PCR der dritten Selektionsrunde (Antigen Lassavirus); Interpretation siehe Text.

	Lassa- virus vor Sel.	dto. vor Sel.	dto. 1.Runde	dto. 1.Runde	dto. 2.Runde	dto. 2.Runde	dto. 3.Runde	dto. 3.Runde	Vero- ZK-ÜS vor Sel.	dto. 3.Runde
Phagen	0,038	0,040	0,021	0,011	0,043	0,036	0,012	0,019	0,017	0,040
Phagen	0,038	0,077	0,040	0,016	0,017	0,025	0,121	0,020	0,334	0,044

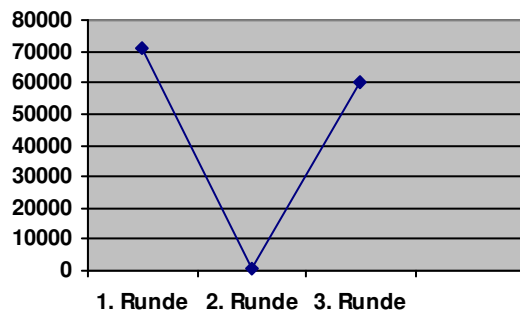
**Abb. 5.22:** Polyklonaler Phagen-ELISA: selektionierte Phagen gegen Lassavirus

Obwohl im Polyklonalen-Phagen-ELISA-Test mit der unselektierten Library nachgewiesen wurde, dass wahrscheinlich spezifische, an Lassavirus bindende Phagen in der Bibliothek existieren, konnte keine Anreicherung von spezifischen Phagen erreicht werden. Theoretisch wird bei der ersten Selektionsrunde ein Abfall der Menge an gerescueten Phagen erwartet, da ja nur wenige spezifisch an das Antigen binden sollen und die restlichen ausgewaschen werden. In der zweiten und dritten Runde erwartet man dann eine Anreicherung dieser spezifischen Phagen, weil diese eine grössere Affinität zum Antigen besitzen. Das hier gezeigte Diagramm (Abb.5.19) zeigt zwar diesen Verlauf an aber weder der Phagen-ELISA, noch das Bstn I-Fingerprinting konnte eine Anreicherung an spezifischen Phagen zeigen. Der Polyklonale Phagen-ELISA in Abb.5.14 wurde mit gamma-inaktiviertem Lassavirus durchgeführt, welches zum Zeitpunkt der durchgeführten Selektion noch nicht zur Verfügung stand. Die Immunotubeselektion wie auch der polyklonale Phagen-ELISA in Abb.5.22 wurde mit Lassavirus durchgeführt, welches mit 1% NP 40 und 3h bei 56°C inaktiviert wurde. Das Koloniescreening in Abb.5.20. zeigt, dass acht von 20 Phagen ein intaktes scFv enthalten haben. Im Bstn I-Fingerprinting (Abb. 5.21.) sind keine identischen Klone zu erkennen, was eigentlich bei spezifische Anreicherung weniger bindender Phagen zu erwarten gewesen wäre.

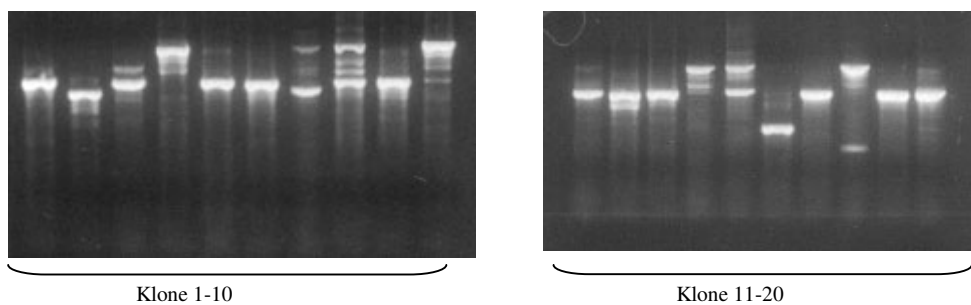
### 5.3.2 Selektion der Bibliothek mit Lassavirus-GP2

Verlauf der Anzahl eluierter Phagen: Selektion auf GP2

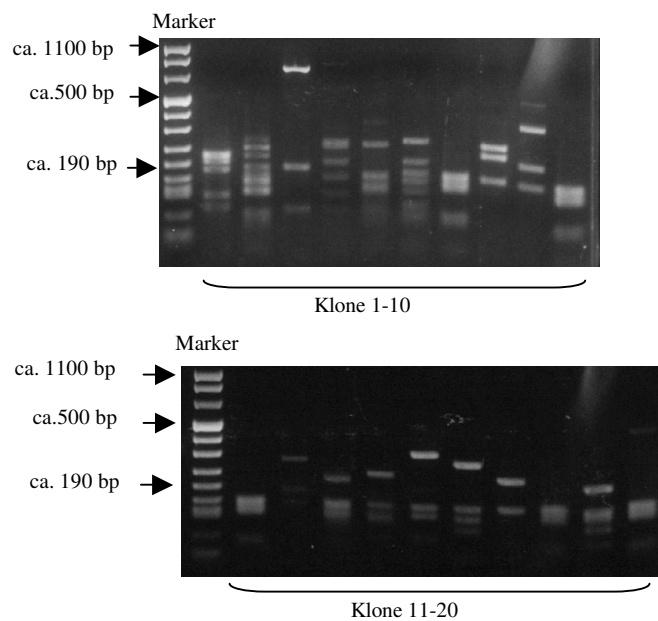
1. Selektionsrunde: ca. 71142 Phagen
2. Selektionsrunde: ca.360 Phagen
3. Selektionsrunde: ca. 60000 Phagen



**Abb. 5.23:** Phagenanzahlverlauf der eluierten Phagen (Antigen Lassavirus-GP2)



**Abb. 5.24:** Koloniescreening der dritten Selektionsrunde (Antigen Lassavirus-GP2)



**Abb. 5.25:** BstNI-Fingerprinting der Kolonie-PCR-Produkte (Antigen Lassavirus-GP2)

	GP2 vor Sel.	dto. vor Sel.	dto. 1.Runde	dto. 1.Runde	dto. 2.Runde	dto. 2.Runde	dto. 3.Runde	dto. 3.Runde	Vero- ZK-ÜS vor Sel	dto. 3.Runde
Phagen	0,060	0,030	0,196	0,031	0,016	0,017	0,021	0,021	0,011	0,027
Phagen	0,012	0,032	0,028	0,013	0,024	0,020	0,027	0,012	0,011	0,034

**Abb. 5.26 :** Polyklonaler Phagen-ELISA: selektionierte Phagen gegen Lassavirus-GP2

Auch bei der Selektion auf rekombinantes Lassa-GP2 konnte keine Anreicherung von spezifisch bindenden Phagen erreicht werden. Es kam zwar auch hier zu einem Anstieg der eluierten Phagenanzahl in der zweiten Selektionsrunde, aber weder das Bstn I-Fingerprinting noch der Phagen-ELISA gaben einen Hinweis auf spezifisch bindende Phagen (Abb.5.26).

### 5.3.3 Selektion der Bibliothek mit Plasmodium-Falciparum-Protein PFF2

Es wurde mit ELISA-Versuchen zuerst nachgewiesen ob sich die verwendeten Nunc ELISA-Platten und die zur Immunoselektion verwendeten Immuntubes mit dem Protein Pff2, welches in 50mM Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6.0 aufgenommen wurde coaten liessen. Dazu wurden Nunc Maxisorb und Polysorb ELISA-Platten miteinander verglichen: Es wurden die Polysorb-Immuntubes ausgewählt, da hier konsistent ein höheres Signal im ELISA gesehen wurde.

	Pff2 25µg/ml	Pff2 12,5µg/ml	GP2 neg. Ko.	Puffer	Pff2 25µg/ml	Pff2 12,5µg/ml	GP2	Puffer
	Maxisorb	dto.	dto.	dto.	Polysorb	dto.	dto.	dto.
Maus- anti-Pff2 1:400	1,651	2,357	0,078	0,061	2,481	2,451	0,073	0,051
dto.	2,198	1,632	0,068	0,057	2,311	2,321	0,066	0,052
dto. 1:800	2,267	1,393	0,084	0,059	2,064	2,086	0,062	0,080
dto.	1,848	1,275	0,063	0,061	2,020	1,986	0,061	0,066
Kontroll- Maus	0,068	0,090	0,059	0,059	0,093	0,054	0,066	0,143

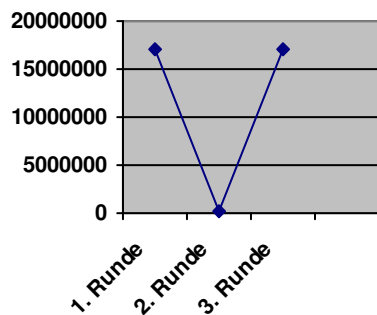
**Abb. 5.27:** Vergleich von Maxisorb und Polysorb ELISA-Platten von Nunc zum Coaten mit Pff2 (ersten vier Spalten Maxisorb, zweiten vier Spalten Polysorb, Doppelansatz)

Bei der Immuntubeselektion mit dem Plasmodium-Falciparum-Protein PfF2 wurden zu der im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellten Phagen-Antikörperbibliothek weitere drei von Herrn Dr. rer.nat. S. Daffis im Labor erstellten Bibliotheken gepoolt um die Wahrscheinlichkeit für die Selektion von Antikörpern zu erhöhen.

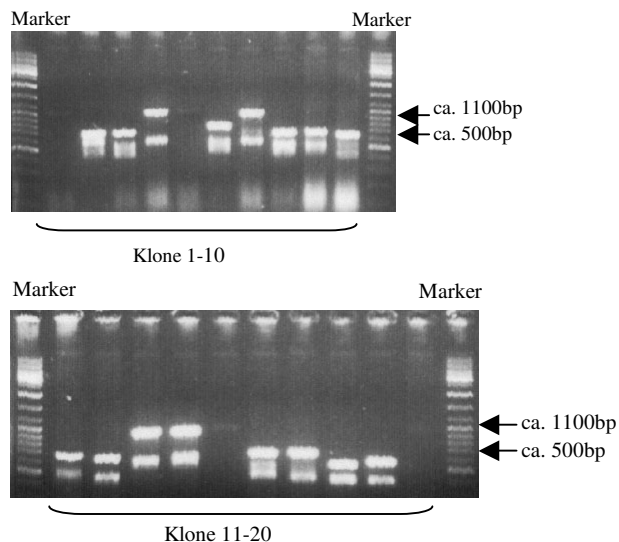
Für das Plasmodium falciparum-Protein PfF2 ergaben sich folgende Ergebnisse:

Verlauf der Anzahl eluierter Phagen: Selektion auf PfF2

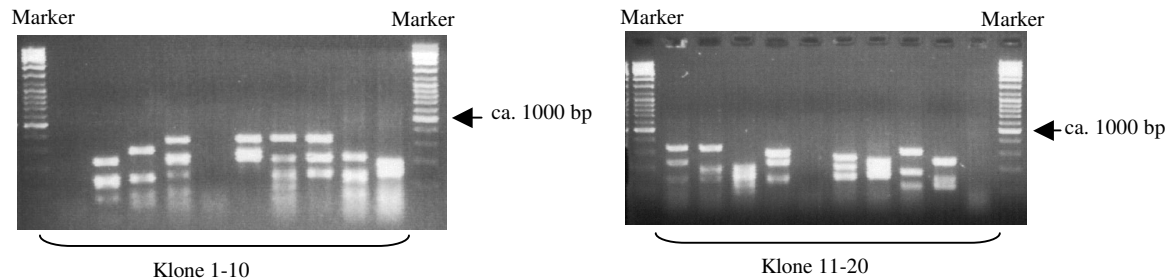
1. Selektionsrunde: ca.  $17 \times 10^6$  Phagen
2. Selektionsrunde: ca. 160000 Phagen
3. Selektionsrunde: ca.  $17 \times 10^6$  Phagen



**Abb. 5.28:** Phagenanzahlverlauf der eluierten Phagen (Antigen PfF2)



**Abb. 5.29:** Koloniescreening der dritten Selektionsrunde (Antigen PfF2)



**Abb. 5.30:** Bstn I-Fingerprinting der Kolonie-PCR-Produkte (Antigen PfF2)

	PfF2	dto.	dto.	dto.	BSA	dto
	100µg/ml				100µg/ml	
	Prä. Sel.	1.Runde	2.Runde	3.Runde	Prä.Sel.	3.Run de.
Phagen	0,661	0,204	0,066	0,059	0,065	0,064
Phagen	0,504	0,103	0,078	0,071	0,059	0,074

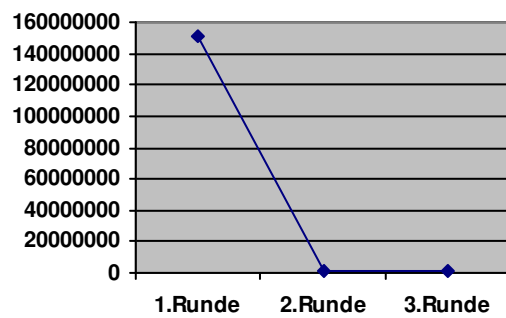
**Abb. 5.31:** Polyklonaler Phagen-ELISA: selektionierte Phagen gegen PfF2 (Doppelansatz)

Bei der Selektion der Phagenbibliothek auf das Plasmodium-Falciparum-Protein PFF2 zeigte sich der schon für die vorhergehenden Antigene beschriebene Verlauf der eluierten Phagenzahlen. Es konnte in diesem Fall im Phagen-ELISA jedoch gezeigt werden, dass in der ersten Selektionsrunde noch bindende Phagen vorhanden gewesen sein mussten. Diese sind dann jedoch in den folgenden Selektionsrunden verloren gegangen und auch im Bstn I-Fingerprinting wurden keine identischen Phagen-Klone gesehen.

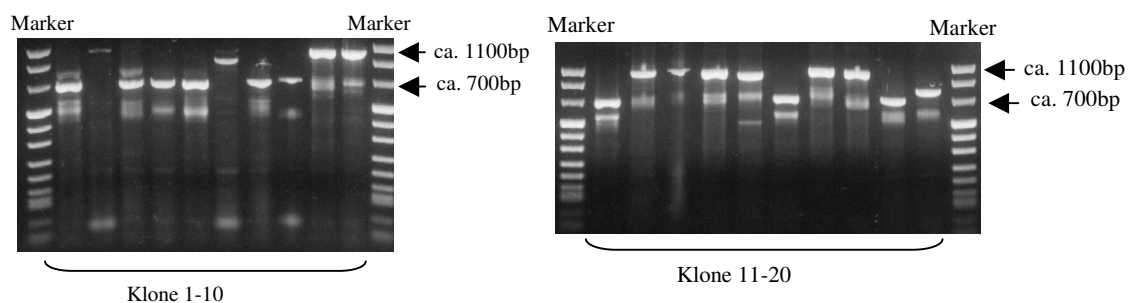
### 5.3.4 Selektion der Bibliothek mit Plasmodium-falciparum (Bandia-Stamm) infizierten Erythrozyten

Verlauf der Anzahl eluierter Phagen: Selektion auf Erythrozyten

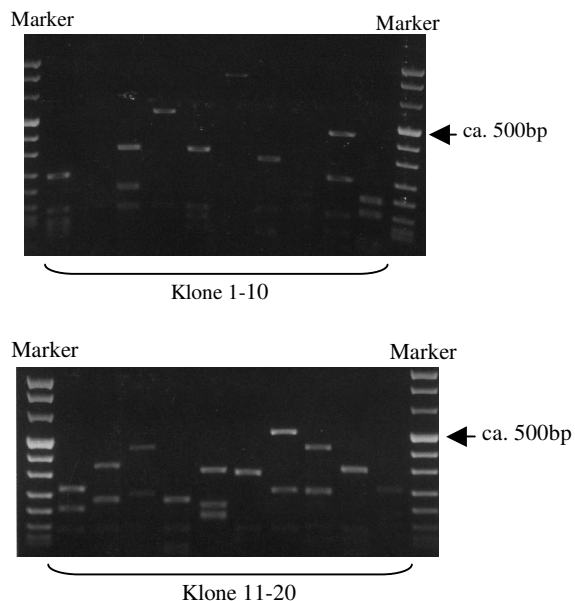
1. Selektionsrunde: ca.  $151 \times 10^6$  Phagen
2. Selektionsrunde: ca.  $1,3 \times 10^6$  Phagen
3. Selektionsrunde: ca.  $1,2 \times 10^6$  Phagen



**Abb. 5.32:** Phagenanzahlverlauf der eluierten Phagen



**Abb. 5.33:** Koloniescreening der dritten Selektionsrunde (Antigen: infizierte Erythrozyten)

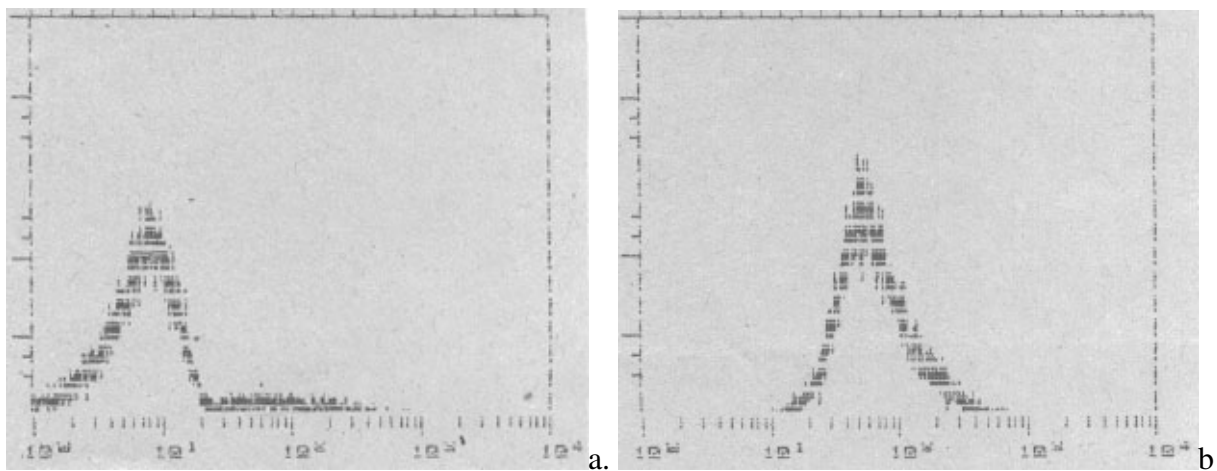


**Abb. 5.34:** Bstn I-Fingerprinting der Kolonie-PCR-Produkte (Antigen Infizierte Erythrozyten)

Der Verlauf der eluierten Phagenzahl zeigte auch hier keine Anreicherung von Phagen. Im Koloniescreening trugen offensichtlich acht Phagen ein intakte scFv-Insert (bzw. je ein Insert I und Insert II der variablen Region der leichten und schweren Antikörperketten). Im Bstn I-Fingerprinting sah man jedoch keinen monoklonalen Phagen, der sich durchgesetzt hätte.

Um auch hier in einem empfindlicheren Antikörper-Antigen-Bindungs-Essay nachzuweisen, dass sich durch die Immunselektion auf infizierte Erythrozyten vielleicht doch spezifisch bindende Phagen angereichert haben, wurden Durchflußzytometrien durchgeführt:

In der FACS-Analyse (Abb. 5.35) ist zu erkennen, dass dreimal mit *Plasmodium-falciparum* infizierten Erythrozyten selektionierte Phagen, an diesen zehnmal stärker binden, als an normale Erythrozyten. Es erfolgt auch eine gewisse Bindung der selektionierten Phagen an normale Erythrozyten. Dies kann darauf zurückgeführt werden kann, dass auch Phagen selektioniert wurden welche an normale Erythrozytenantigene binden, trotz Vorinkubation der Bibliothek.



**Abb. 5.35:** Durchflußzytometrie der Phagen mit nicht-infizierten und *P.falciparum*-infizierten Erythrozyten

a. Inkubation von normalen Erythrozyten mit Phagen, welche drei Mal mit malariainfizierten Erythrozyten selektioniert wurden

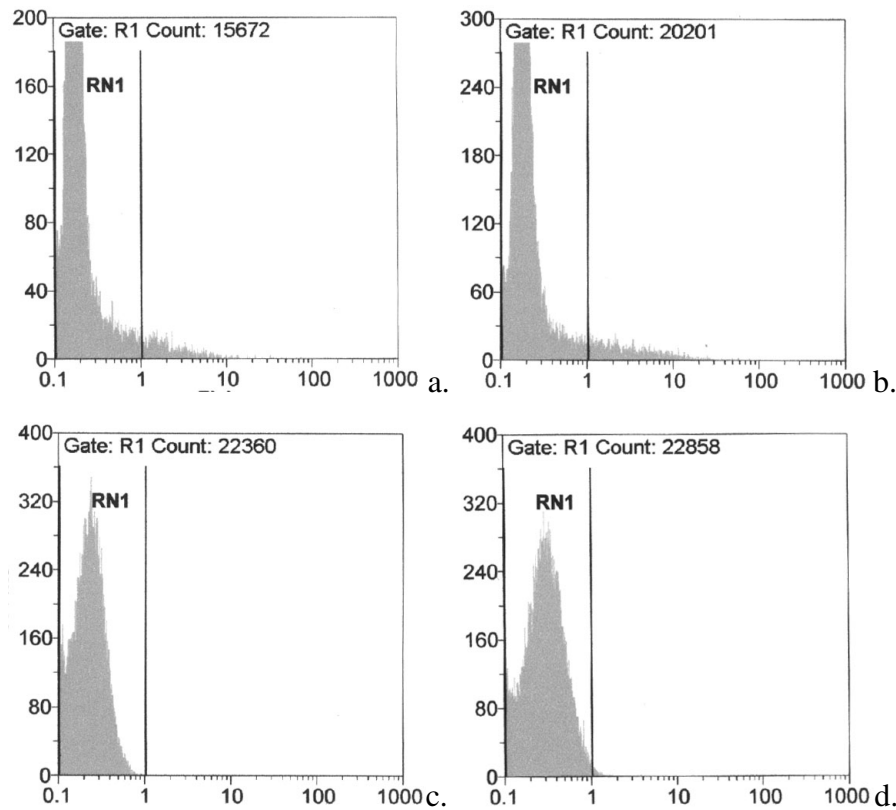
b. Inkubation von malariainfizierten Erythrozyten mit Phagen, welche drei Mal mit malariainfizierten Erythrozyten selektioniert wurden

( zur Inkubation der unselektierten Bibliothek mit Erythrozyten siehe Abb.5.18)

### 5.3.5 FACS-Analyse von monoklonal exprimierten, auf *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten selektierten Phagen

Dazu wurden einzelne Phagenklone hergestellt, indem bei der jeweils letzten Selektionsrunde einzelne Kolonien von den Agarplatten gepickt wurden und diese nach dem Protokoll des Phagenrescue zu monoklonalen Phagen vermehrt wurden. Aus Abb. 5.36. a und b ist ersichtlich, dass der monoklonale Phage 49 offensichtlich sowohl an normale als auch an infizierte Erythrozyten bindet. Es scheint also eine Selektion auf ein immer auf der Erythrozytenoberfläche vorhandenes Antigen geschehen zu sein. Der Klon 51 scheint weder an normale noch an in infizierte Erythrozyten zu binden.



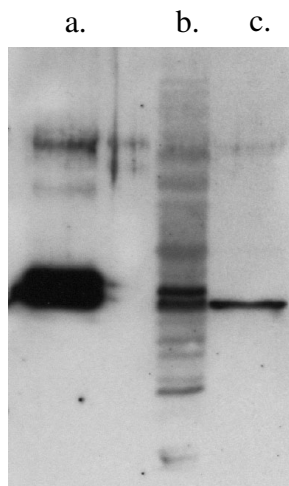


**Abb. 5.36:** Beispiele von FACS-Analysen Monoklonaler Phagen auf Erythrozyten.

- Klon 49 inkubiert mit normalen Erythrozyten
- Klon 49 inkubiert mit malariainfizierten Erythrozyten
- Klon 51 inkubiert mit normalen Erythrozyten
- Klon 51 inkubiert mit malariainfizierten Erythrozyten

#### 5.4 Expression löslicher monoklonaler Antikörperfragmente

Um exemplarisch die Möglichkeit zur monoklonalen Herstellung der löslichen Antikörperfragmente zu dokumentieren wurden sechs monoklonale Phagen zur löslichen Expression von scFv eingesetzt. Die sechs monoklonalen Phagen wurden ausgewählt, da sie mehr oder weniger Bindung an normale oder Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten zeigten und im Koloniescreening ein intaktes scFv-Gen enthielten. Dabei zeigte sich, dass sich nur ein Klon exprimieren ließ und im Westernblot nachweisbar war. Die anderen Klone enthielten möglicherweise Stop-Codons, so dass es bei der Expression zu einem Synthese-Abbruch kam.



**Abb. 5.37:** Westrenblotanalyse von exprimierten scFv:

- a. scFv als Positivkontrolle ( freundlicherweise von R. Kontermann zur Verfügung gestellt)
- b. Bakterienlysat von mit Phagenklon 49 transformierten Expressionsbakterien HB2151
- c. dto. Überstand der Kultur

Als nächster Schritt könnte hier dann die Expression von weiteren monoklonalen Antikörperfragmenten stehen, welche dann wiederum auf ihre Fähigkeit zur Bindung an das zur Selektion verwendete Antigen getestet werden könnte. Dies war aus zeitlichen Gründen nicht mehr Teil dieser medizinischen Doktorarbeit.

## 6 Diskussion

Ziel dieser medizinischen Doktorarbeit war es die Phage-Display-Technik im Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. ter Meulen *de novo* zu etablieren. Es wurde eine Antikörper-Phagen-Bibliothek erstellt. Diese wurde durch verschiedene Versuche charakterisiert und es sollten mit Hilfe von verschiedenen Antigenen tropischer Erreger, monoklonale Antikörper-Phagen selektionieren werden.

### 6.1. Erstellung der Phage-Display-Antikörperbibliothek

Die Lymphozyten des Spenders aus Guinea erschienen zur Generierung der Antikörper-Phagen-Bibliothek geeignet, weil der Spender anamnestisch sicherlich Malaria-Erkrankungen durchlebt hat und er nachgewiesene Antikörper und reaktive Lymphozyten gegen Lassavirus-Antigene als Zeichen von abgelaufener Lassa-Infektion hatte (ter Meulen). Es ist bekannt, dass asymptomatische Reinfektionen vorkommen (Fisher-Hoch 2001), ob diese als erneute Stimulation der humoralen Immunantwort bei unserem Probanden erfolgte ist nicht bekannt. Prinzipiell ist es sinnvoll die Lymphozyten in zeitlicher Nähe zur Erkrankung bzw. Infektion zu gewinnen. Bei der Erstellung der rekombinanten Antikörperbibliothek wurden die Gene für die variablen Ketten der IgM-Antikörper nicht amplifiziert, da keine IgM-Antwort nachweisbar war. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass der Prozentsatz Lassa-spezifischer Plasmazellen und B-Lymphozyten in der peripheren Zirkulation sehr gering war. Die langlebigen Plasmazellen und die B-memory-Zellen wandern bereits einige Monate nach der akuten Infektion in die Lymphorgane und in das Knochenmark (A.K. Abbas 1996). Aus diesem Grund ist es auch sinnvoll die Antikörperbibliothek aus Knochenmarkszellen herzustellen, wie es von anderen Arbeitsgruppen praktiziert wurde (Björling et al. 2002). Damit könnte ein größerer Pool an B-Lymphozyten erfasst werden, die sich dort hauptsächlich aufhalten, insbesondere auch besagte Memoryzellen. Unter der Annahme, dass eine Antikörperbibliothek konstruiert aus den Genen der variablen Regionen der Antikörper das Repertoire der Antikörper in den peripheren Lymphozyten widerspiegelt, sollten in dieser Arbeit mittels Phage-Display monoklonale Antikörperphagen mit Reaktivität gegen das Lassavirus, das Lassavirus-GP2 und rekombinante sowie native Malaria-Antigene selektiert werden.

Die mRNA von Lymphozyten wurde in cDNA umgeschrieben, mittels PCR amplifiziert und in einen Phagemidvektor kloniert um dann die besagte Bibliothek zu generieren.

## ***6.2. Eigenschaften und Charakterisierung der erstellten Phage-Display-Antikörperbibliothek***

In Bezug auf die Qualität sind Größe und Diversität der rekombinanten Phagenantikörperlibrary ausschlaggebend für das Selektieren der gesuchten Antikörper (R. Kontermann 2000). Die erste Ligation in den Phagemidvektor pHEN3, d.h. der variablen Gene der leichten Ketten, ergab für die kappa- und lambda-Ketten jeweils ca. 3 Millionen Klone. Die zweite Ligation ergab für Kappa 4 Millionen und für lambda 3 Millionen Klone. Nach der zweiten Klonierung sah man im Koloniescreening einen Anteil von 75% für Phagen, welche beide Inserts trugen. Da in keinem Restriktionsverdau und keiner Sequenzierung ein gleichartiges Muster gefunden wurde ging man von einer Library-Diversität von ca. 5,25 Millionen verschiedenen Klonen aus. In der Literatur werden Phagen-Bibliotheken (immunisiert oder nicht immunisiert) mit Größen zwischen  $10^8$ - $10^9$  verschiedenen Klonen angegeben, so dass die hier generierte Phagen-Bibliothek sehr klein ist. Durch die Verwendung von peripheren Blutlymphozyten aus 43 Spendern zur Herstellung einer Antikörper-Phagen-Bibliothek konnten P. Lafaye et al. eine sehr diverse aber für das zur Selektion verwendete Crotoxin (ein Schlangengift) naive Bibliothek mit  $10^{10}$  Klonen herstellen und Antikörper gegen dieses isolieren, obwohl die Spender sicherlich keinen Kontakt vorher damit hatten. Nicht zu verwechseln ist die Klonanzahl und Diversität der Library mit dem Phagentiter der hergestellten Phagenlösung. Diese kann im letzten Arbeitsschritt, der Aufnahme in PBS variiert werden und somit Werte bis zu  $10^{15}$  pfu/ml erreichen. Die verwendete Technik bringt es im Übrigen mit sich, dass Kombinationen von Antikörpergenen kloniert wurden, welche so im Menschen nicht vorkommen (Benkovic et al. 1991). Dies erhöht die Diversität der Library zusätzlich und im Idealfall die Wahrscheinlichkeit, spezifisch an das gewählte Antigen bindende Antikörper zu finden. Die Möglichkeit mit diesen unnatürlichen Antikörpern spezifische Bindungen möglich zu machen und nachzuweisen zeigt sich u.a. sehr eindrucksvoll in der Tatsache, dass es möglich ist vollständig synthetische rekombinante Phage-display-peptide-libraries herzustellen und dann Bindung nachzuweisen (R. Howard et al. 2001). Bei der therapeutischen Anwendung dieser künstlichen Antikörper könnten sich jedoch Probleme mit Immunisierung und Allergischen Reaktionen ergeben.

Sequenzanalyse: Es wurden 14 zufällig ausgewählte Phagen-Klone der unselektionierten Bibliothek mit dem Primer LMB3 für das Schwerketten-Insert sequenziert, um einen Überblick über die Qualität der Bibliothek zu bekommen. Es zeigte sich, dass tatsächlich Antikörperregionen in den PCR-Reaktionen amplifiziert und in den Phagenvektor pHEN3 kloniert wurden. Bei BlastP-Analysen gegen die Datenbank auf der Internetseite

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) konnten Alignements mit teilweise erheblichen Homologien zu gelisteten Antikörpersequenzen gefunden werden. Bestätigend für das Vorgehen bei der Erstellung der Phagenbibliothek konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei allen sequenzierten und translatierten Aminosäuresequenzen um Immunglobulin-Schwerkettensequenzen handelt. Damit ergab sich für Phagen, welche beide Inserts (leichte und schwere Kette Variableregion) hineinkloniert bekamen und sich durch Mutation kein Stopkodon ergab die Möglichkeit scFv zu exprimieren. Unsere Aminosäuresequenzen hatten in manchen Fällen Übereinstimmungen bis zu über 93% mit Abschnitten von in der Datenbank gelisteten Antikörpersequenzen. Diese homologen Sequenzen fanden sich in Antikörpern gegen eine Vielzahl von vorkommenden Antigenen. Die große Anzahl an Übereinstimmungen mit gelisteten Antikörpern erklärt sich daraus, dass Antikörper in ihren variablen Regionen durchaus ähnlich sein können, und die Bindung an ein spezifisches Antigen durch unterschiedliche Sequenzen in den hypervariablen Regionen der Complementary-Determining-Regions erreicht wird. Die gefundene Ähnlichkeit zu einem gelisteten SARS-Antikörper, welcher aus einer naiven Bibliothek isoliert wurde, besteht zufällig. Der gefundene Pneumokokken-Antikörper kann mit einer durchgemachten Infektion erklärt werden.

Möglicherweise durch Mutation entstandene Stop-Codons in der Phagen-Bibliothek können die Zahl exprimierbarer Antikörper noch verkleinern.

### ***6.3. Screening und Selektion der erstellten Phage-Display-Antikörperbibliothek durch Antigenbindung***

Die erstellte Antikörperbibliothek wurde in einem Standard Phagen-ELISA Verfahren getestet und es zeigte sich in mehrmaliger Wiederholung, dass Phagen aus der Bibliothek, vor anreichernder Immunotube-Selektion, an Lassavirus binden. Es zeigte sich ein mehr als dreimal stärkeres Signal zur Negativkontrolle. Diese ELISA-Testung wurde mit durch Bestrahlung inaktiviertem Lassavirus durchgeführt, welches leider für die Immunselektion nicht zur Verfügung stand. Die Immunselektion auf Lassavirus wurde mit Virus durchgeführt, welches nach seiner Züchtung in Zellkultur aus dem Zellkulturüberstand mittels Sucrosegredienten angereichert wurde und dann mit 1% NP 40 und Hitze inaktiviert wurde. Es gelang, wie im Ergebnisteil (Abb. 5.19-5.22) gezeigt keine Anreicherung von spezifischen Phagen. Dies kann man auf verschiedene Gründe zurückführen: Es ist durchaus möglich, dass das in Detergenz befindliche Virus zu stark denaturiert wurde oder nicht gut genug in den Immunotubes haftete und bei den Waschschritten aus den Tubes samt den gebundenen

Phagen heraus gewaschen wurde. Auch kann die Konzentration an Virus zum Coaten der Immunotubes zu gering gewesen sein. Es wurden dann in den Phagenrescues nur noch Phagen angereichert, die unspezifisch am Tube hafteten oder aus anderen Gründen einen Vermehrungsvorteil hatten. Sie könnten etwa zu dem Anteil der Phagen in der Bibliothek gehören, welcher nicht vollständige scFv-Antikörperfragmente exprimierte oder welche ein Stop-Codon erhielten. Wie im Ergebnissteil gezeigt betrug der Anteil an nichtkompletten, also unerwünschten Phagen in der Bibliothek zwischen 20 und 45%. Einen ersten Hinweis auf spezifische Anreicherung hätten Gruppen von gleichartigen Mustern im BstN1-Restriktionsverdau gegeben. Da die in der Akutphase gebildeten Antikörper, nicht-neutralisierend und meist gegen das Nukleoprotein des Lassavirus gerichtet sind und erst spät in der Rekonvaleszenz Antikörper gegen das Glykoprotein 1 und 2 gebildet werden, versuchte man Antikörperphagen gegen das GP2 anzureichern. Da GP2 das am höchsten konservierte Strukturprotein der Arenaviren ist und konservierte T-Zell und B-Zell Epitope trägt, wurde es für die Selektion verwandt (ter Meulen 2004). Leider gelang auch hier eine Anreicherung von spezifischen Phagen nicht, und die Gründe dafür können einerseits wieder an der Qualität der Bibliothek liegen, andererseits aber auch am bakteriell exprimierten GP2 als Antigen, welches so nur unglykosiliert gebildet wird und nicht die native dreidimensionale Struktur besitzt.

FACS-Analysen mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten: Um die Antigen-Antikörper-Bindung von Spenderserum und der Phagen mit *P. falciparum* zu untersuchen bedienten wir uns der FACS-Analyse. Dies ermöglichte insbesondere die oben erwähnten Knobs auf *P. falciparum*-infizierten Erythrozyten in ihrer nativen Form zu verwenden. Es wurde gezeigt, dass Humanseren in der FACS-Analyse an infizierte Erythrozyten binden und sich dies mit Hilfe der Phagenlibrary reproduzieren lässt. Das Serum des Spenders aus Afrika erzeugte auf infizierten Erythrozyten eine etwa zehnmal stärkere Fluoreszenz als die Negativkontrolle aus Europa. Die Bindungsunterschiede zwischen nicht-infizierten Erythrozyten und Infizierten waren auch im Bereich dieser Größenordnung. Nach Selektion der Phagenbibliothek auf infizierten Erythrozyten zeigte sich ein spezifisches Signal, wobei auch nicht selektionierte Phagen zehnmal stärker an infizierte, als an nicht-infizierte Zellen banden.

Antikörper-Antigen-Bindung an PfF2: Ein wesentlicher und Erfolg versprechender Ansatz zur Produktion einer Malariavakzine besteht darin die Invasion der Parasiten in die Erythrozyten durch Antikörper zu verhindern.

Wie schon angesprochen bindet Plasmodium falciparum mit dem Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen (EBA-175) an Sialinsäurereste des Glycophorin A der Erythrozyten. Die bindende Domäne des EBA-175 liegt in einer Region, die PfF2 genannt wird. Diese Domäne ist konserviert und findet sich auch in Plasmodium Vivax wieder, welches damit an das Duffy-Binding-protein von roten Blutkörperchen bindet. Obwohl die Parasiten auch andere Wege finden in die Zellen einzutreten, konnte von Chetan et al. gezeigt werden, dass Immunität gegen PfF2 alleine ausreichen kann den Eintritt zu blockieren. Auch haben Versuche dieser Gruppe gezeigt, dass Antiseren gegen PfF2 das gesamte EBA-175 erkennen können. Anti-PfF2-Kaninschen-Serum konnte in den von uns verwendeten Plasmodium Stämmen kein Antigen erkennen (siehe Abb.5.13.). Möglicherweise ist der Antikörper zu spezifisch und konnte nicht an andere leicht unterschiedliche PfF2 binden. Die Seren der afrikanischen Lymphozytenspenden hingegen konnten das aus Südamerika stammende PfF2 im Westernblot erkennen, was für das Protein als konservierten Vakzinekandidaten spricht. Auch im polyklonalen Phagen-ELISA mit der unselektionierten Bibliotheken konnte eine im Vergleich zur Negativkontrolle stärkere Bindung nachgewiesen werden. Leider gelang in mehreren Selektionsversuchen keine spezifische Anreicherung von bindenden Phagen. Obwohl wie man erwarten würde die Anzahl der eluierten Phagen in der dritten Selektionsrunde stark anstieg war im polyklonalen Phagen-ELISA keine Bindung mehr nachzuweisen. Das Signal im ELISA war nach der ersten Runde stärker als nach Runde zwei und drei. Möglicherweise wurden in der ersten Runde niedrig affine Phagen selektioniert, welche dann in der zweiten Runde verloren gingen, was am niedrigen Phagen-Titer zu sehen war. Ein Ansatz wäre hier gewesen, mit den selektionierten Phagen der ersten Runde bei weniger stringenten Waschbedingungen eine erneute Immunotube-Selektion durchzuführen. Expression eines scFv in Bakterien und Westernblotanalyse: Von sechs ausgewählten Klonen konnte einer bakteriell exprimiert und in der Westernblot-Analyse nachgewiesen werden. Dies bestätigt nochmals, dass sich aus der Phagen-Bibliothek zu einem gewissen Anteil (in dieser kleinen Stichprobe 1/6) funktionelle Antikörper exprimieren lassen.

#### ***6.4. Schlußfolgerung und Ausblick***

1. Es wurde eine Phage-Display-Antikörper-Bibliothek erfolgreich kloniert und es konnten funktionelle Antikörper durch Sequenzierung und bakterielle Expression nachgewiesen werden.
2. Die Grösse der Phagen-Bibliothek reichte mit ca. 5,25 Millionen verschiedenen Klonen zum Finden von Antikörpern gegen die hier verwendeten Antigene, bis auf *P. falciparum* infizierte Erythrozyten, nicht aus. Es sollten weitere Bibliotheken gepoolt oder künstlich generierte Bibliotheken mit mindestens  $10^8$  verschiedenen Klonen verwendet werden.
3. Die Verwendeten Lassavirusantigene (NP40 inaktiviertes Virus und GP2) reichten in ihrer Qualität für eine gute Antigen-Antikörper-Bindung wahrscheinlich nicht aus. Zur Antikörper-Phagen-Selektion sollte z.B. Röntgen-bestrahltes Virus genommen werden, welches in seiner Proteinstruktur am wenigsten beschädigt ist.
4. Der Abnahmezeitpunkt der Lymphozyten für die Generierung der Bibliothek war nicht optimal und sollte näher bei der Erkrankung liegen, alternativ könnte Knochenmark entnommen werden.



## 7 Literaturverzeichnis

**Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., , Zheng Zhang J. Z., Miller W., and Lipman D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

**Barbas III C. F., Kang A. S., Lerner R. A., and Benkovic S. J.** (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7978-7982.

**Cardoso D.F., Nato F., England P., Ferreira M.L., Vaughan T.J., Mota I., Mazie J.C., Choumet V. and Lafaye P.** (2000) Neutralizing Human Anti Crotoxin scFv Isolated from a Nonimmunized Phage Library. *Scand. J. Immunol.* **51**: 337-344.

**Casadevall A.** (1999) Passive Antibody Therapies: Progress and Continuing Challenges. *Clinical Immunology, Short Analytical Review* **9**: 5-15.

**Chen Q., Schlichterle M., Wahlgren M.** (2000) Molecular Aspects of Severe Malaria. *Clinical Microbiology Reviews* **13**: 439-450.

**Clegg, J.C.S.** (1992). Current progress towards vaccines for arenavirus-caused diseases. *Vaccine* **10**: 89-95.

**Cummins D., McCormick J.B., Bennett D., Samba J.A., Farrar B., Machin S.J., Fisher-Hoch S.J.** (1990). Acute sensorineural deafness in Lassa fever. *JAMA* **264**: 2093-2096.

**De Carvalho Nicacio C., Williamson R.A., Parren P.W.H.I., Lundkvist A., Burton D.R. and Björling E.** (2002) Neutralizing Human Fab Fragments against Measles Virus Recovered by Phage Display. *Journal of Virology* **76**: 251-258.

**D`Mello F. and Howard C.R.** (2001) An improved selection procedure for the screening of phage display peptide libraries. *Journal of Immunological Methods* **247**:191-203.

**Dodoo D., Staalsoe T., Giha H., Kurtzhals J.A.L., Akanmori B.D., Koram K., Dunyo S., Nkrumah F.K., Hvild L. and Theander T.G.** (2001) Antibodies to Variant Antigens on the Surface of Infected Erythrocytes Are Associated with Protection from Malaria in Ghanaian Children. *Infection and Immunity* **69**: 3713-3718.

**E. von Behring** (1913) Un Nouveau Moyen Preventif Contre la Diphterie. *Imprimerie de la semaine médicale* 1913.

**Fisher-Hoch S.P., McCormick J. B., Auperin D., Brown B. G., Castor M., Perez G., Ruo S., Conaty A., Brammer L. and Bauer S.** (1989) Protection of rhesus monkeys from fatal Lassa fever by vaccination with a recombinant vaccinia virus containing the Lassa virus glykoprotein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 317-321.

**Fisher-Hoch S.P. and McCormick J.B.** (2001) Toward a human Lassa fever vaccine. *Rev. Med. Virol.* **11**: 331-341.

**Fisher-Hoch S.P., Hutwagner L., Brown B. and McCormick J.B.** (2000) Effective Vaccine for Lassa Fever. *J. Virol.* **74**: 6777-6783.

**Gamain B., Miller L.H., and Baruch D.I.** (2001) The surface variant antigens of *Plasmodium falciparum* contain cross-reactive epitopes. *PNAS* **98**: 2664-2669.

**Günther S., Emmerich P., Laue T., Kühle O., Asper M., Jung A., Grewing T., ter Meulen J. and Schmitz H.** (2000) Imported Lassa Fever in Germany: Molecular Characterization of a New Lassa Virus Strain. *Emerging Infectious Diseases* **6**:466-476.

**Hoogenboom H.R. and Chames P.** (2000) Natural and designer binding sites made by phage display technology. ...**6**:371-378.

**Hoogenboom H. R., Griffiths A. D., Johnson K. S., Chiswell D. J., Hudson P. and Winter G.** (1991) Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Research* **19**: 4133-4137.

**Jahrling P.B., Peters C.J., Stephen E.L.** (1984) Enhanced treatment of Lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgous monkeys. *J. Infect. Dis.* **149**: 420-427.

**Johnson, K.M., McCormick, J.B., Webb, P.A., Smith, E.S., Elliott, L.H. and King I.J.** (1987) Clinical virology of Lassa fever in hospitalized patients. *J Infect Dis.* **155(3)**: 456-464.

**Karasu Z., Ozacar T., Akyildiz M., Demirbas T., Arikan C., Kobat A., Akarca U., Ersoz G., Gunsar F., Batur Y., Kilic M. and Tokat Y.** (2004) Low-dose hepatitis B immune globulin and higher-dose lamivudine combination to prevent hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Antivir Ther.* **9**:921-7.

**Kontermann R.** (2000) Recombinant Antibody Fragments for Cancer Therapy. *Mod. Asp. Immunobiol.* **1**: 88-91.

**Lenz O., ter Meulen J., Klenk H.-D., Seidah N. G. and Garten W.** (2001) The Lassa virus glykoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 12701-12705.

**Lukashevich I.S., Maryankova R., Vladyko A. S., Nashkevich N., Koleda S., Djavani M., Horejsh D., Voitenok N. N. and Salvato M. S.** (1999) Lassa and Mopeia Virus Replication in Human Monocytes/Macrophages and in Endothelial Cells. *Journal of Medical Virology* **59**:552-560.

**Malaguarnera L. and Musumeci S.** (2002) The immune response to Plasmodium falciparum malaria. *The Lancet Infectious Disease* **2**: 472-478.

**Margaretha Isaäcson** (2001) Viral Hemorrhagic Fever Hazards for Travelers in Africa. *Travel Medicine* **33**:1707-1712.

**Maruyama T., Rodriguez L.L., Jahrling P.B., Sanchez A., Khan A.S., Nichol S.T., Peters C.J., Parren P.W.H.I. and Burton D.R.** (1999) Ebola Virus can be effectively Neutralized by Antibody Produced in natural human infection. *J.Virol* 6024-6030.

**McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G.** (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.

**McCormick J.B., Fisher-Hoch S.P.** (2002) Lassa fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **262**: 75-109.

**McCormick J.B., Webb P.A., Krebs J.W., Johnson K.M., Smith E.S.** (1987). A prospective study of the epidemiology of Lassa fever. *J Infect Dis* **155**: 437-444.

**Noviyanti R., Brown G. V., Wickham M. E., Duffy M. F., Cowman A. F., Reeder J.C..** (2001) Multiple var gene transcripts are expressed in Plasmodium falciparum infected erythrocytes selected for adhesion. *Molecular & Biochemical Parasitology* **114**: 227-237.

**Pandey K. C., Singh S., Pattnaik P., Pillai C.R., Pillai U., Lynn A., Jain S.K., Chitnis C. E.** (2002) Bacterially expressed and refolded receptor binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175 elicits invasion inhibitory antibodies. *Molecular & Biochemical Parasitology* **123**: 23-33.

**Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P. and Smith J.** (2001) Individual and Bivalent Vaccines Based on Alphavirus Replicons Protect Guinea Pigs against Infection with Lassa and Ebola Viruses. *J. Virol.* **75**: 11677-11685.

**Roeffen ,W.F.G., Raats, J.M.H., Teeln, K., Hoet, R.M.A., Elingt, W.M., van Venrooij, W.J., Sauerwein, R.W.** (2001) Recombinant Human Antibodies Specific for the Pfs48/45 Protein of the Malaria Parasite Plasmodium falciparum. *JBC* **276**: 19807-19811.

**Siddhartha Mahanty, Daniel G. Bausch, Renee L. Thomas, Augustin Goba, Alpha Bah, Clarence J. Peters, and Pierre E. Rollin.** (2001) Low Levels of Interleukin-8 and Interferon-Inducible Protein-10 in Serum Are Associated with Fatal Infections in Acute Lassa Fever. *The Journal of Infectious Diseases* **183**:1713-21.

**Siddhartha Mahanty, Karen Hutchinson, Sudhanshu Agarwal, Michael Mcrae, Pierre E. Rollin, and Bali Pulendran.** (2003) Impairment of Dendritic Cells and Adaptive Immunity by Ebola and Lassa Viruses. *The Journal of Immunology* **170**:2797-2801.

**Sui J., Li W., Murakami A., Tamin A., Matthews L.L., Wong S.K., Moore M.J., Tallarico A., Olurinde M., Choe H., Anderson L.J., Bellini W.J., Farzan M., and Marasco W.A.** (2004) Potent neutralization of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a human mAB to S1 protein that blocks receptor association. *PNAS* **101**:2536-2541.

**Staalsoe T., Giha H.A., Dodoo D., Theander T.G. and Hviid L.** (1999) Detection of Antibodies to Variant Antigens on Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes by Flow Cytometry. *Cytometry* **35**: 329-336.

**Ter Meulen J.** (1999) Lassa fever: implications of T-cell immunity for vaccine development. *J. Biotechnol.* **73**: 207-212.

**Ter Meulen J.** (2000) Lassa Fever: Immuno-Epidemiological Approach To The Study Of Endemic Viral Haemorrhagic Fever . *Médecine Tropicale*. **20-22**: 2000.60.2S

**Ter Meulen J., Badusche M., Kuhnt K., Doetze A., Satoguina J., Marti T., Loeliger C., Koulemou K., Koivogui L., Schmitz H., Fleischer B. and Hoerauf A.** Characterization of Human CD4+ T-Cell Clones Recognizing Conserved and Variable Epitopes of the Lassa Virus Nucleoprotein. *Journal of Virology* **74**: 2186-2192.

**Ter Meulen Jan, Lenz O., Koivogui L., Magassouba N., Kaushik S. K., Lewis R. and Aldis W.** (2001) Short communication: Lassa fever in Sierra Leone: UN peacekeepers are at risk. *Tropical Medicine and International Health* **6**: 83-84.

**Ter Meulen J., Badusche M., Satoguina J., Strecker Th., Lenz O., Loeliger C., Sakho M., Koulemou K., Koivogui L. and Hoerauf A.** (2004) Old and New World arenaviruses share a highly conserved epitope in the fusion domain of the glycoprotein 2, which is recognized by Lassa virus-specific human CD4+ T-cell clones. *Virology* **321**: 134-143.

**Ter Meulen J., van den Brink E., Poon L.L.M., Marissen W.E., Leung C.S.W., Cox F., Cheung C.Y., Bakker A.Q., Bogaards J.A., van Deventer E., Preiser W., Doerr H.W., Chow V.T., de Kruif J., Peiris J.S.M. and Goudsmit J.** (2006) Human monoclonal

Antibody Combination against SARS Coronavirus: Synergy and Coverage of Escape Mutants. *PLOS Medicine* **3**:0001-0008.

**ter Meulen J., Lukashevich I., Sidibe K., Inapogui A., Marx M., Dörlemann A., Yansane M.L., Koulemou K., Chang-Claude J., Schmitz H.** (1996). Hunting of peridomestic rodents and consumption of their meat as possible risk factors for rodent-to-human transmission of Lassa virus in the Republic of Guinea. *Am J Trop Med Hyg* **55**(6): 661-666.

**Trkola A., Kuster H., Rusert P., et al.** (2005) Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **11**(6):615-622.

### Allgemeine Literatur

**Fields B. N. et al.** (1996) *Fields Virology*, 3. Auflage

**Modrow S. & Falke D.** (1998) *Molekulare Virologie*, 1. Auflage

**Abul K. Abbas et al.** (1996) *Immunologie*, 2. Auflage

**Gill G.V.** (2004) *Lecture notes on Tropical Medicine* , 5. Auflage

**Köhler W., Eggers H. J., Fleischer B., Marre R., Pfister H., Pulverer G.** (2001) *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage

## **Danksagung**

Herrn PD Dr. Jan ter Meulen möchte ich danken für die geduldige Betreuung meiner Doktorarbeit im Labor und während der schriftlichen Ausarbeitung, sowie für die interessanten Anregungen im Feld der Virologie.

Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk möchte ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutschens, Betreuung und seine wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Promotion danken.

Herrn Dr. Oliver Lenz und Frau Dr. Nicole Runkler danke ich für die Unterstützung bei den ersten und zweiten Gehversuchen im Labor.

Herrn Dr. Kekoura Koulemou, Dr. Lamine Koivogui und Soroma danke ich für die Gastfreundschaft in Guinea.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie für die immer herzliche und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinen Eltern Maria und Gerhard Gabriel für die endlose Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Gülsah Gabriel für die ständige und liebevolle Unterstützung.

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten**

Name:	Martin Gabriel
Geburtsdatum:	07.04.1976
Geburtort:	Cottbus, Deutschland
Wohnort:	Cappeler Str. 13, 35039 Marburg
Familienstand:	verheiratet

### **Schulausbildung**

1982-1984	Grundschule in Dessau
1984-1987	Grundschule in Koroncò, Ungarn.
1987-1989	Schickhardt Gymnasiums
1989-1995	Gymnasium Stuttgart-Freiberg
22.06.1995	Abitur

### **Hochschulausbildung**

06.03.1997 -27.05.2004	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
01.09.2004-30.09.2007	Assistenzarzt am Universitätsklinikum Giessen-Marburg, Standort Giessen Medizinische Klinik II



## **Verzeichnis akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Dauth, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Jungclas, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Kretschmer, Kroll, Lammel, Lang, Lennartz, Maisch, Moll, Moosdorf, Mutters, Oertel, Remschmidt, Renz, Rothmund, Schneider, Seybert, Slenzka, Steiniger, Weihe, Werner

## **Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**„Konstruktion einer rekombinanten Phage-Display-Antikörper Bibliothek zur Isolierung von humanen monoklonalen Antikörpern gegen Lassavirus und Plasmodium falciparum“**

im Institut für Virologie, Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg (Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk) unter Leitung von PD Dr. Jan ter Meulen mit Unterstützung von Dr. Oliver Lenz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bislang an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende noch eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 25.09.2007

---

Martin Gabriel